

Aus der
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. J. Werner



Entwicklung eines Fusionsantikörpers zur lokalen Immunsuppression

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rena Julia Sebisch
aus München

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Markus Guba

Mitberichterstatter:

PD Dr. Teresa Kauke

PD Dr. Gerhard Preissler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

28.11.2024

Für all meine treuen Wegbegleiter

ZUSAMMENFASSUNG	7
SUMMARY	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 TRANSPLANTATION UND IHRE IMMUNOLOGIE.....	9
1.1.1 Eine kurze Geschichte der Organtransplantation	9
1.1.2 Warum wir Organe nicht einfach tauschen können.....	9
1.1.3 Was passiert, wenn wir Organe doch „tauschen“?.....	10
1.1.4 Immunsuppression aktuell	11
1.2 DER PD-1/PD-L1/2 IMMUNCHECKPOINT	12
1.2.1 Was über den Checkpoint schon bekannt ist.....	12
1.2.2 Was wir von Tumoren lernen können	14
1.3 ANTIKÖRPER: DIE THERAPIEN DER GEGENWART UND ZUKUNFT	16
1.3.1 Was sind Antikörper.....	16
1.3.2 Therapeutische Antikörper.....	17
2 ZIELE.....	19
3 MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 MATERIAL	20
3.1.1 E. coli Stamm	20
3.1.2 Zelllinien	20
3.1.3 Vektoren	20
3.1.4 Oligonukleotide.....	21
3.1.5 Aminosäuresequenzen.....	24
3.1.6 Kommerzielle Antikörper	25
3.1.7 Puffer und Medium	25
3.1.8 Technische Geräte	26
3.1.9 Software	27
3.2 METHODEN.....	27
3.2.1 Antikörperdesign.....	27
3.2.2 Klonierung	28
3.2.3 PCR und Mutagenese.....	28
3.3 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	31
3.3.1 Transformation in E.coli.....	31
3.4 ZELLKULTUR	31
3.4.1 Antikörpergewinnung aus Hybridomzelllinien HB158 und HB162.....	31
3.4.2 Splenozyten	32
3.4.3 Rekombinante Proteinexpression in HEK293-basiertem Expressionssystem	32
3.4.4 T-Zell-Linien für FACS und ADCC – EG7.....	33

3.5	PROTEIN-BIOCHEMISCHE METHODEN.....	33
3.5.1	Proteinaufreinigung mit Protein A	33
3.5.2	Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.5.3	Größenausschluss-Chromatographie (SEC)	34
3.5.4	Western Blot.....	34
3.6	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	35
3.6.1	Detektion von PD-1 auf Black-6-T-Zell-Linien	35
3.6.2	Bindungs-FACS und Dissoziationskonstante „K _D “	36
3.7	IN VITRO ASSAYS	36
3.7.1	Temperaturstabilität	36
3.7.2	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)	37
3.7.3	Tycho.....	38
3.8	STATISTISCHE ANALYSE.....	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	DESIGN DER ANTIKÖRPER	39
4.2	GENERIERUNG DER ANTIKÖRPER	41
4.2.1	Expression und Proteinreinigung	41
4.2.2	Evaluation der Proteinstabilität von CAT ₁ I und CAT ₁ 2.....	43
4.3	EVALUATION DER ZIELZELLINIEN	44
4.3.1	PD-1 Expression	44
4.3.2	MHC-I Expression	45
4.4	BINDUNGSANALYSE	46
4.4.1	Bindung an MHCI und MHCII	46
4.4.2	Bindung PD-1	46
4.4.3	Bindung von CAT ₁ I und CAT ₁ 2	47
4.4.4	KD-FACS.....	48
4.5	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG	50
4.5.1	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)	50
5	DISKUSSION	52
5.1	ANTI-KÖRPERFORMAT – DIE RICHTIGE WAHL?.....	52
5.2	MHC - EIN SPEZIFISCHES ZIEL.....	54
5.3	DIE IMMUNSUPPRESSIVE KOMPONENTE	54
5.4	OPTIMIERUNG DES ADCC-ASSAYS.....	55
5.5	RISIKEN UND NEBENWIRKUNGEN.....	56
5.6	AUSBLICK	56
6	QUELLENVERZEICHNIS	58
7	TABELLENVERZEICHNIS	61

8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	61
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	64

Zusammenfassung

Die Transplantation solider Organe bietet eine wichtige Therapieoption für akute und chronische Erkrankungen verschiedener Organsysteme, insbesondere wenn andere therapeutische Maßnahmen ausgeschöpft sind. Für betroffene Patient: innen kann dies lebensverlängernd wirken. Um akute oder chronische Abstoßungsreaktionen zu verhindern, ist eine lebenslange Immunsuppression erforderlich, die jedoch mit erheblichen negativen Folgen verbunden ist. Dazu gehören ein erhöhtes Risiko für Hospitalisierungen aufgrund von Infektionen durch opportunistische Erreger sowie eine gesteigerte Inzidenz von Tumorerkrankungen im Zusammenhang mit langfristiger Immunsuppression. Daher besteht dringender Bedarf an neuen therapeutischen Strategien, die keine generalisierte Immunsuppression verursachen, sondern spezifisch jene T-Zellen hemmen, die an der Abstoßungsreaktion beteiligt sind.

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung von Fusionsproteinen im Antikörperformat, die eine lokale Bindung des MHC-I Komplexes, welcher im gewählten Mausmodell dem H2-Kb Molekül entspricht, bewirken und zusätzlich eine immunmodulatorische Komponente besitzen. Durch die hochaffine Bindung an den MHC-I Komplex wird dieser maskiert und eine Erkennung durch empfängereigene T-Zellen wird blockiert. Als inhibitorische Komponente haben die Fusionsproteine die extrazelluläre Domäne von PD-L1 oder PD-L2 angehängt. Die niedrigaffine Bindung von PD-L1/2 an von T-Zellen exprimiertes PD-1 wird dadurch genutzt, dass nur T-Zellen in unmittelbarer Nähe gebunden werden und somit eine generalisierte T-Zell-Inhibition von zirkulierenden T-Zellen unwahrscheinlich ist.

Die Fusionsantikörper wurde zunächst für das Mausmodell entwickelt und entsprechen „Checkpoint aktivierenden T Zell Inhibitoren“ (CAT_i). Eine in vitro Testung auf Bindung, Stabilität und Zytotoxizität wurde durchgeführt und zeigte sowohl eine affine Bindung als auch Temperaturstabilität bei 37°C über 7 Tage. Eine weitere in-vitro und in-vivo Evaluation ist notwendig, allerdings können die entwickelten Antikörperformate als vielversprechende Prototypen für eine neue Form der immunsuppressiven Therapie betrachtet werden.

Summary

Solid organ transplantation offers an important therapeutic option for acute and chronic diseases of various organ systems, especially when other therapeutic measures have been exhausted. For affected patients, this can have a life-prolonging effect. Lifelong immunosuppression is required to prevent acute or chronic rejection reactions, but this is associated with considerable negative consequences. These include an increased risk of hospitalisation due to infections caused by opportunistic pathogens and an increased incidence of tumour diseases associated with long-term immunosuppression. Therefore, there is an urgent need for new therapeutic strategies that do not cause generalised immunosuppression but specifically inhibit those T cells involved in the rejection response.

This work describes the development of fusion proteins in antibody format that bind to the MHC-I complex, which corresponds to the H2-Kb molecule in the selected mouse model, and have an immunomodulatory component attached. The high-affinity binding to the MHC-I complex masks it and blocks recognition by the recipient's own T cells. The fusion proteins have an attachment of the extracellular domain of PD-L1 or PD-L2 as an inhibitory component. The low-affinity binding of PD-L1/2 to PD-1 expressed by T cells is utilised by the fact that only T cells in the immediate vicinity are bound, making generalised T cell inhibition of circulating T cells unlikely.

The fusion antibodies were initially developed for the mouse model and are called 'checkpoint activating T cell inhibitors' (CATi). An in vitro test for binding, stability and cytotoxicity was performed and showed both affinity binding and temperature stability at 37°C for 7 days. Further in-vitro and in-vivo evaluation is necessary, but the developed antibody formats can be considered as promising prototypes for a new form of immunosuppressive therapy.

1 Einleitung

1.1 Transplantation und ihre Immunologie

1.1.1 Eine kurze Geschichte der Organtransplantation

Die Idee Organe eines Menschen einem anderen zu geben ist alt. Nach einer chinesischen Sage soll ein Arzt die Herzen von zwei Patienten ausgetauscht haben und das bereits um 6000 v.Chr. Die erste erfolgreiche Nierentransplantation beim Menschen fand allerdings erst 1939 statt, auch wenn der Begriff erfolgreich mit Vorsicht zu genießen ist, denn der Empfänger verstarb bereits nach wenigen Tagen (1). Der erste wirkliche Erfolg konnte 1954 verzeichnet werden, als Joseph E. Murray seinem Patienten die Niere des eineiigen Zwillingsbruders transplantieren konnte (2). In den folgenden Jahren gelang es verschiedene andere Organe zu transplantieren: Herz, Lunge, Leber, Pankreas und Dünndarm bis hin zur Transplantation eines Uterus mit anschließender Schwangerschaft im Jahr 2013 (3).

Die Indikationen für die Transplantation von soliden Organen sind vielfältig. Eine Sache haben jedoch alle gemeinsam: die Wartezeit für ein neues Organ ist lang. So waren im Jahr 2021 zwar 5090 Patient:innen auf der Warteliste registriert, insgesamt gab es aber nur 3260 Organtransplantationen (4). Umso wichtiger erscheint es, die Transplantation selbst und die postoperative Versorgung so erfolgreich wie möglich zu gestalten, um das Organ möglichst lange erhalten zu können.

1.1.2 Warum wir Organe nicht einfach tauschen können

Warum die erste Transplantation 1939 nur kurzzeitig erfolgreich war, liegt an der Herkunft der gespendeten Niere. Fremde Organe kann der Körper von Eigenen schnell unterscheiden. Verantwortlich hierfür ist u.a. die Expression der Major Histocompatibility Komplexe (MHC)-Moleküle, beim Menschen auch Human Leucocyte Antigen (HLA) genannt. Man unterscheidet mehrere Klassen. Klasse I Moleküle werden auf sämtlichen Zelloberflächen exprimiert, Klasse II Moleküle nur auf antigenpräsentierenden Zellen. Beide sind für die Präsentation von körpereigenen und -fremden Peptiden verantwortlich, ohne die eine adaptive Immunantwort mit T-Zell-Aktivierung nicht möglich wäre. MHC-Moleküle zeichnen sich durch ihren außerordentlichen Polymorphismus aus. Das heißt, dass die MHC-Gene für viele verschiedene Ausprägungsformen codieren. Dadurch ist unser Immunsystem besonders anpassungsfähig und individuell. Unter anderem reagiert jeder Mensch deswegen anders auf einen Erreger und jedes Gewebe, ähnlich einem Fingerabdruck, ist einem Individuum zuzuordnen (5, 6).

Bei einer Organtransplantation wird nun nicht ein von körpereigenem HLA präsentiertes Antigen durch T-Zellen erkannt, sondern aber die körperfremden HLA selbst. Auch das löst unter anderem eine T-Zell-Aktivierung aus, was zur Transplantatabstoßung führt. Je ähnlicher die HLA von Spender und Empfänger sind, desto geringer fällt diese Immunantwort aus. Deshalb wird inzwischen vor einigen Transplantationen ein so genanntes HLA-Matching durchgeführt, wobei überprüft wird wie kompatibel Spender und Empfänger sind. Die optimale Variante hierbei ist eine Organspende wie 1954 durchgeführt: zwischen eineiigen Zwillingen, denn diese stimmen in ihren HLA-Merkmalen überein (2).

1.1.3 Was passiert, wenn wir Organe doch „tauschen“?

Kommt ein körperfremder Organismus in unser Blutsystem, so wird er durch zwei Teile unseres Immunsystems „bekämpft“. Der angeborene Teil des Immunsystems, besteht aus einer Vielzahl an Zellen, die schnell und unspezifisch auf den Erreger reagieren. Der zweite, und für die Transplantationsimmunologie relevantere Teil, ist das adaptive Immunsystem. Hierzu zählen die T-Zellen als zellvermittelte und B-Lymphozyten als humorale Immunantwort. Die T-Zellen oder auch T-Lymphozyten können in drei Hauptgruppen unterteilt werden: die CD4-positiven T-Helferzellen (T_H), die CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (T_c) und zuletzt die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}).

Die Aktivierung einer T-Zelle benötigt mehrere Signale.

- (1) Durch antigenpräsentierende Zellen, worunter Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen fallen, werden Antigene der Pathogene aufgenommen und zu kurzen Peptiden verdaut. Die auf der Zelloberfläche befindlichen MHCII-Moleküle werden dann mit diesen Peptiden beladen und erst dann können sie von T-Zellen erkannt werden. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) eines T-Lymphozyten bindet spezifisch an das peptidbeladene MHCII-Molekül, dies entspricht dem ersten Signal der nun ablaufenden Aktivierung der T-Zelle.
- (2) Das zweite Signal sind streng genommen mehrere Co-Signale, die entweder stimulierender oder inhibierender Natur sind. Die Interaktion zwischen CD80 und CD28 bspw. stimuliert, die Bindung von PD-1 an PD-L1 inhibiert die T-Zelle wieder. Durch das parallele Ablaufen dieser Signale wird erreicht, dass die Stärke der Aktivierung reguliert und der Situation angepasst werden kann.

(3) Als nächstes folgt das dritte Signal, wobei durch Zytokinausschüttung die Zelldifferenzierung beeinflusst wird.

Es handelt sich hierbei also keineswegs um einen immer gleich ablaufenden Prozess, sondern viel mehr um eine sehr anpassbare und spezifische Reaktion auf ein Pathogen (7, 8).

1.1.4 Immunsuppression aktuell

Das Verständnis der T-Zell-Aktivierung ist für die Transplantationsmedizin von besonderer Bedeutung, denn die Abstoßung eines Organs erfolgt primär darüber.

Die Abstoßungsreaktionen werden gegliedert in Hyperakute Abstoßung, Akute Abstoßung und Chronische Abstoßung. Die Hyperakute Abstoßung ist antikörperassoziiert, die akute und die chronische hingegen T-Zell-gekoppelt. (9) Die T-Zellen werden im Lymphknoten durch Bindung der mit spenderspezifischen Antigenen beladenen MHC-Komplexe an TCRs aktiviert, proliferieren und wandern in das transplantierte Gewebe ein. Solche T-Zellen erkennen dann die körperfremden Zellen und töten die Zielzelle, in diesem Fall die Zellen des transplantierten Organs, ab. T-Helferzellen aktivieren gleichzeitig B-Zellen, wodurch es zur Ausbildung spezifischer Antikörper gegen das Spenderorgan kommt. Dies kumuliert sich bei der chronischen Organabstoßung zur stetigen, progressiven Zellschädigung des Transplantats (5). Die Immunsuppression ist somit nach jeder soliden Organtransplantation essenziell und dient primär der Vermeidung der akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen. Der primäre Ansatzpunkt für aktuelle therapeutische Strategien ist die T-Zell-Aktivierung und -Reifung (9). Die gängigsten aktuell zugelassenen Immunsuppressiva der Transplantationsmedizin und ihre Wirkungsorte sind schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

Aus der systemischen Immunsuppression ergeben sich für die Patient:innen jedoch lebeenseinschränkende Nebenwirkungen und Risiken. Die Anfälligkeit für und Letalität von Infektionserkrankungen, insbesondere bei opportunistischen Krankheitserregern, steigt deutlich an (10). Die Prävention beinhaltet regelmäßige Impfungen, das Vermeiden von großen Menschenmengen oder das Tragen einer Maske als einfach umsetzbare Maßnahmen.

Weiterhin ist Risiko für de novo Tumorerkrankungen wirkstoffabhängig erhöht (11) und auch Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität und die Auslösung von Post Transplant Diabetes mellitus (PTDM) werden vermehrt beobachtet (12).

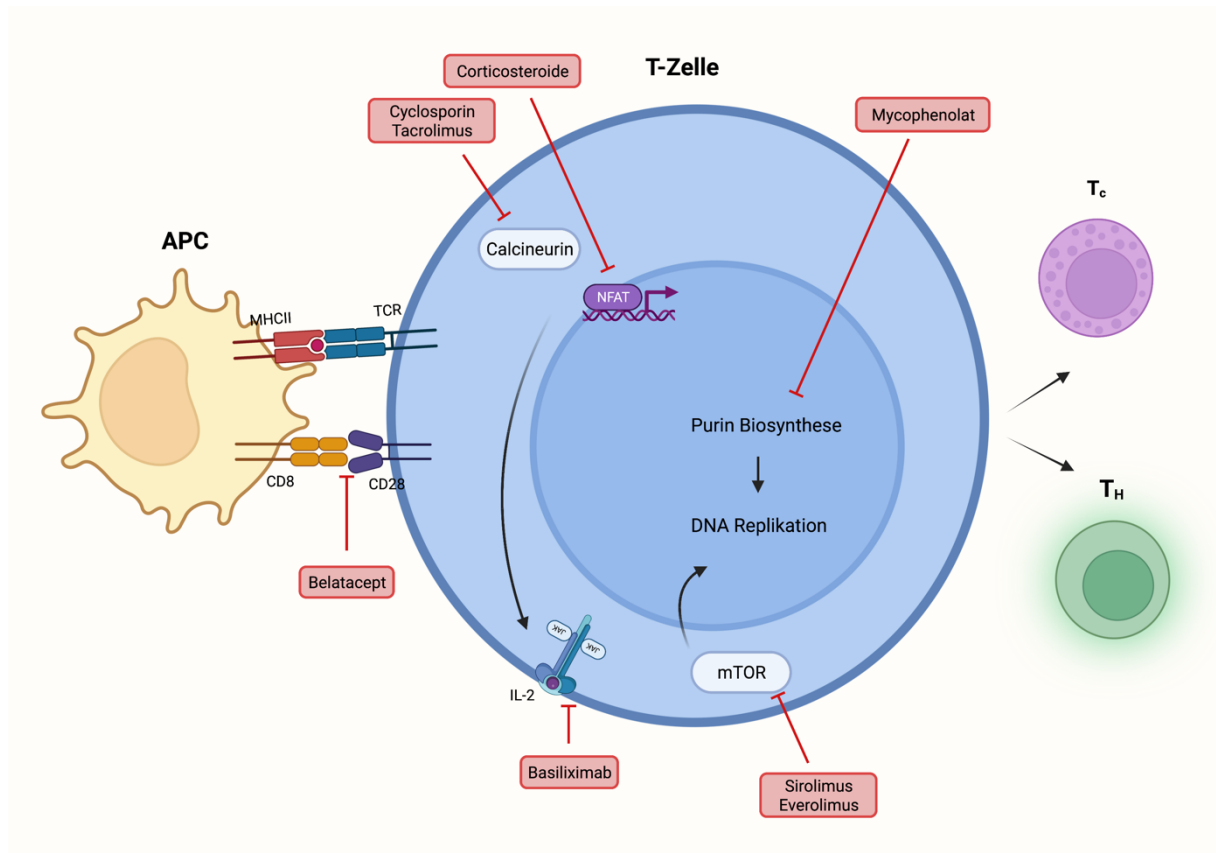


Abbildung 1: Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung mit Einblendung gängiger Immunsuppressiver Therapien an ihren Ansatzpunkten. APC = Antigen präsentierende Zelle. mTOR = mammalian target of rapamycin. IL2 = Interleukin 2. NFAT = Nuclear factor of activated T cells. T_c = Zytotoxische T-Zelle. T_H = T-Helferzelle.

1.2 Der PD-1/PD-L1/2 Immuncheckpoint

1.2.1 Was über den Checkpoint schon bekannt ist

PD-1 (Programmed Cell Death Protein 1) gilt als „potenter Regulator der Immunantwort“ (13). Der Rezeptor wird auf B-, T-, Dendritischen und weiteren Immunzellen sowie auf Tumorzellen exprimiert. Die Expression auf den körpereigenen Immunzellen kann durch immunregulatorische Signale gesteigert werden.

Der Rezeptor bindet im Rahmen der T-Zell-Aktivierung an einen seiner Liganden: Programmed Death Ligand 1 oder 2 (PD-L1 1/2) und es kommt zur Blockade bzw. Herunterregulation des T-Zell-Rezeptor-Signalwegs.

Strukturell ähnelt PD-1 einem Antikörper ohne FC-Anteil, funktionell wird er eher der CD28/B7 Familie zugeordnet. (15) Die Proteinstruktur von PD-1 setzt sich aus einem extrazellulären und einem intrazellulären Teil zusammen.

Der extrazelluläre Teil von PD-1 besteht aus einer Signalpeptidsequenz und einer IgV-ähnlichen (immunoglobulin-like) Domäne. Letztere ist entscheidend für die Bindung an seine Liganden, PD-L1 und PD-L2. Der intrazelluläre Teil von PD-1 umfasst Immunorezeptor-Tyrosin-basierte Inhibitions motive (ITIM) und Immunorezeptor-Tyrosin-basierte Schalter motive (ITSM). Nach Bindung von PD-1 an seine Liganden werden diese Motive phosphoryliert und rekrutieren inhibierende Proteine wie SHP-1 und SHP-2. Diese Proteine hemmen die Aktivierung von Signalwegen, die für die T-Zell-Funktion entscheidend sind, und führen somit zur Dämpfung der Immunantwort. (14, 15)

Die Liganden PD-L1 und PD-L2 bestehen ebenfalls aus einem kleineren intrazellulären Teil und dem größeren extrazellulären Teil. Der extrazelluläre Teil wiederum besteht aus zwei Domänen, die IgV-ähnliche und C-ähnliche-Domäne. Die Bindung der Liganden an PD-1 erfolgt lediglich über die V-like-domain, dies ist in Abbildung 2 anhand der Kristallstruktur dargestellt. (16, 17)

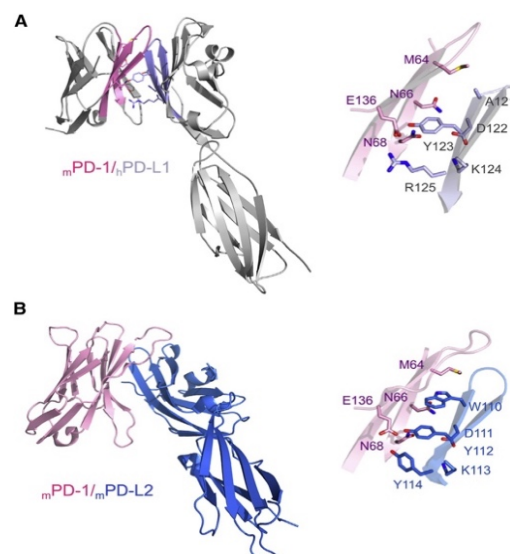


Abbildung 2: Kristallstruktur der Komplexe aus mPD-1 mit hPD-L1/mPD-L2. *Komplex aus mPD-1/hPD-L1 (A) und mPD-1/mPD-L2 (B). Bei beiden Komplexen ist sichtbar, dass die Bindung von PD-1 an seinen Liganden nur über den V-like-Domäne erfolgt. (17)*

PD-L1 kann außer PD-1 auch B7-1 (CD28) binden und stellt damit eine mögliche Verlinkung zwischen dem CTLA4/CD28 und dem PD-1/PD-L1 Signalweg dar. (13)

Das Zusammenspiel der beiden, und vieler weiterer, Signalwege erlaubt die Feinregulation der T-Zell-Aktivierung. Die CTLA4-Expression auf T-Zellen wird durch die Antigenpräsentation und Bindung des T-Zell-Rezeptors induziert, die Induktionsstärke ist proportional von der Affinität des Liganden zum T-Zell-Rezeptor abhängig. CTLA4 bewirkt dann eine Downregulation des Proliferationssignals und verhindert dadurch die Überstimulation der T-Zelle. Im Gegensatz dazu reguliert PD-1 die Inflammatorische Antwort im Verlauf, bspw. im peripheren Gewebe und verhindert hier durch erneute Downregulation der T-Zell-Aktivierung eine Gewebeschädigung. (18)

1.2.2 Was wir von Tumoren lernen können

Die T-Zell-Erschöpfung (engl. T-cell-exhaustion) ist ein Zustand der funktionellen Erschöpfung von T-Zellen, die durch eine anhaltende Aktivierung und Exposition gegenüber chronischen oder wiederkehrenden Stimuli verursacht wird. Die Erschöpfung von T-Zellen geht einher mit einer Veränderung der Genexpression sowie einer verminderten Proliferation und Produktion von Zytokinen, was insgesamt zu einer verminderten Aktivität der T-Zellen führt. Dieses Phänomen wird bei chronischer Infektion wie HIV oder Hepatitis-B oder C Infektion und bei verschiedenen Krebsarten beobachtet.(19) Beim hepatozellulären Karzinom konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von PD-1 auf CD-8 positiven T-Zellen und der T-Zell-Erschöpfung nachgewiesen werden. Im Tumorumfeld exprimieren die Krebszellen PD-L1, und in einigen Fällen auch PD-L2. PD-L1 ist ein Ligand für PD-1. Wenn PD-1 auf den T-Zellen mit PD-L1 auf den Krebszellen interagiert, wird ein inhibierendes Signal ausgelöst. Die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 erzeugt ein inhibierendes Signal, das die Aktivität der CD-8-positiven T-Zellen hemmt. Dieses inhibierende Signal kann zu einer Erschöpfung der T-Zellen führen, wodurch ihre Funktion beeinträchtigt wird. Die T-Zell-Erschöpfung, die durch die Interaktion von PD-1 mit PD-L1 gefördert wird, beeinträchtigt die Immunantwort gegen das hepatozelluläre Karzinom. Die gedämpfte Funktion der CD-8-positiven T-Zellen kann dazu führen, dass der Tumor nicht effektiv bekämpft wird und sich

weiter ausbreitet. (20) Der Checkpoint scheint also maßgeblich an der Immunevasion beteiligt zu sein. Ein weiteres Beispiel bietet das Triple Negative Mammakarzinom (TNBC). Färbt man Schnitte eines TNBC immunhistochemisch gegen PD-L1 an zeigt sich auch hier die deutliche Expression des Liganden auf der gesamten Oberfläche (siehe Abbildung 2) (21). Verbildlicht schützt sich das Tumorgewebe wie ein Igel mit seinen Stacheln gegen die körpereigenen T-Zellen.

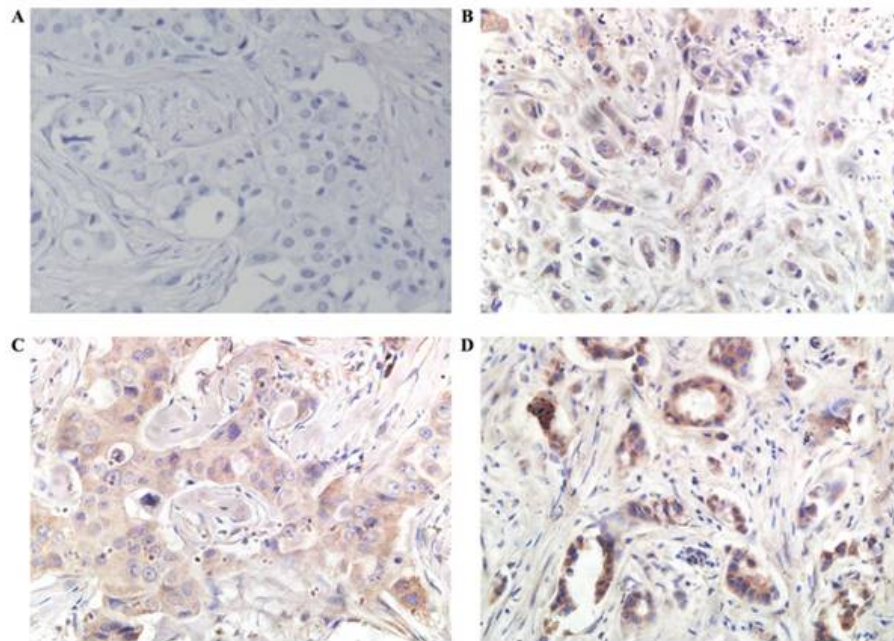


Abbildung 3: Mikrophotographien von Schnitten eines Triple negativen Mammakarzinoms nach immunhistochemischer Färbung auf PD-L1. Korrelation zwischen PD-L1-Expression und Prävalenz von Tumor-infiltrierenden Lymphocyten (TIL). Die PD-L1 Expression und die Prävalenz von TIL sind mit einem längeren Gesamtüberleben und Krankheitsfreies Überleben assoziiert. Quelle: AiErken, Shi (21)

- A) PD-L1 0+
- B) PD-L1 1+
- C) PD-L1 2+
- D) PD-L1 3+

Inzwischen sind zahlreiche PD-1-Inhibitoren entwickelt worden, die die PD-1/PD-L1-Interaktion blockieren und die T-Zell-Aktivierung und -Funktion wiederherstellen können.

Diese stellen eine vielversprechende Form der Immuntherapie dar und haben bereits zu signifikanten Verbesserungen der Behandlung verschiedener Tumorklassen geführt (22).

1.3 Antikörper: die Therapien der Gegenwart und Zukunft

1.3.1 Was sind Antikörper

Antikörper sind Teil des adaptiven Immunsystems und werden von Plasmazellen produziert. Plasmazellen entstehen wiederum aus B-Lymphozyten, die nach Antigenkontakt proliferieren. Ein Antikörpermolekül setzt sich aus Aminosäureketten zusammen, zwei sogenannten schweren und zwei leichten Ketten, die jeweils identisch sind. Zusammen bilden sie eine konstante (Fragment crystallizable; F_c) und eine variable Region (Fragment variable; F_v) des Antikörpers aus, die variable Region ist die Antigenbindungsstelle und spezifisch für den jeweiligen Antikörper.

Es wird zwischen 5 Hauptklassen von Antikörpern unterschieden:

1. IgG (Immunglobulin G) stellt die größte Gruppe der Antikörper dar und ist bei vielen Immunreaktionen beteiligt. Durch ihre kleinere Größe sind sie gut gewebeängig, was ihre Häufigkeit erklärt. IgG sind u.a. plazentagängig und bilden den sogenannten Nestschutz von Neugeborenen aus, bevor sich das eigene Immunsystem ausgebildet hat.
2. IgM (Immunglobulin M) sind an der primären Immunantwort beteiligt und weniger spezifisch als IgG.
3. IgA (Immunglobulin A) werden konstant in Schleimhäuten des Menschen sezerniert und sind damit an der Erhaltung einer natürlichen Barriere beteiligt.
4. IgE (Immunglobulin E) sind vor allem an der Abwehr parasitärer Erkrankungen beteiligt und spielt eine Rolle bei der Entwicklung von Allergien.
5. IgD (Immunglobulin D) sind die seltenste Form der Antikörper und ihre Funktion ist nicht abschließend geklärt. (5, 9, 23)

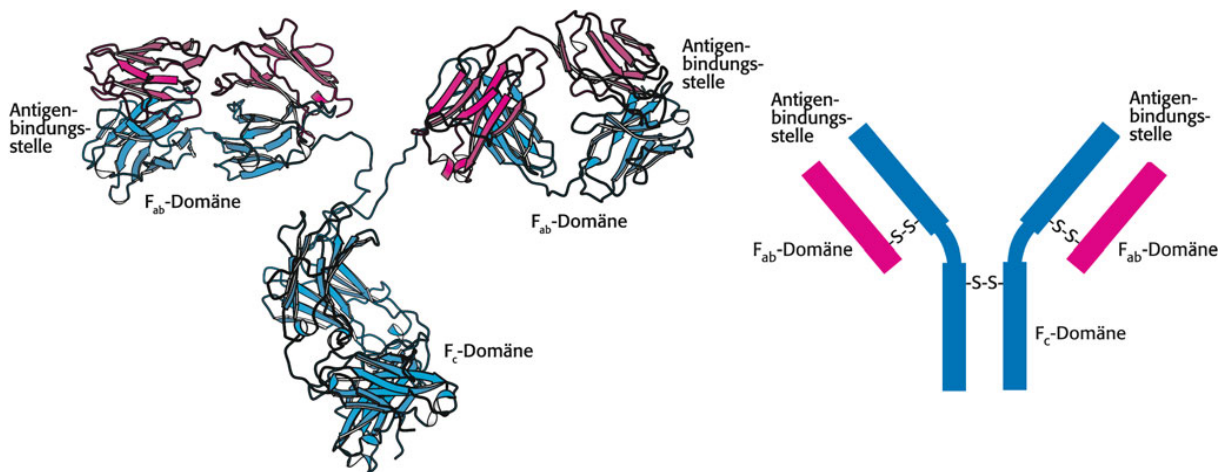


Abbildung 4: Struktur eines Antikörpers. (23)

Links: Darstellung eines Antikörpers in Tertiärstruktur (2D) bestehend aus zwei schweren Ketten (blau) und zwei leichten Ketten (rot), die zusammen die beiden variablen Domänen F_{ab} mit der Antigenbindungsstelle bilden sowie der F_c Domäne, die unter anderem an der Komplementaktivierung beteiligt ist.
Rechts: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.

1.3.2 Therapeutische Antikörper

Die ersten Methoden zur Herstellung spezifischer Antikörper wurden bereits 1975 von Milstein und Köhler beschrieben. Generell gibt es zwei Wege: Isolierung aus dem Überstand von Hybridomzelllinien oder Rekombinante Herstellung. Hybridomzelllinien entstehen aus der Fusion von B-Lymphozyten mit z.B. Melanom Zellen. Dadurch sind sie fähig Antikörper mit einer spezifischen Bindungsstelle in höheren Mengen zu sezernieren und sind gleichzeitig leicht und stabil zu kultivieren. Die sezernierten Antikörper können dann geerntet und für therapeutische oder wissenschaftliche Zwecke angewandt werden. (24, 25) Bei der Rekombinanten Herstellung (Klonierung) werden mit Hilfe von Restriktionsenzymen zwei Expressionsvektoren, die für Variabel Heavy (VH) und Variabel Light (VL) codieren generiert. Diese Expressionsvektoren werden in eine Expressionszelllinie transfiziert, die dann in der Lage ist, VH und VL herzustellen, zu einem Antikörper zusammenzulagern und zu sezernieren. Beide Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit angewandt.

Die Entwicklung dieser Methoden im Jahr 1975 eröffnete neue Möglichkeiten der therapeutischen Anwendung, da Antikörper nun spezifisch, beliebig und in größerem Maßstab hergestellt werden konnten. Inzwischen finden sich die häufig als Immuntherapie bekannten Antikörper in der Tumorthherapie oder zur Therapie von Autoimmunerkrankungen (26). Ein bekanntes Beispiel ist Pembrolizumab. Es handelt sich um einen gegen PD-L1 gerichteten

Antikörper und wird in der Therapie von Mammakarzinomen, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC), Malignen Melanomen und weiteren malignen Erkrankungen eingesetzt. Strukturell entspricht Pembrolizumab einem humanisierten monoklonaler IgG-Antikörper, der durch seine Bindung an von Tumorzellen exprimiertes PD-L1 den Liganden blockiert und die sonst ausgelöste T-Zell-Inhibition hemmt. (27) In einer Studie zu NSCLC konnte gezeigt werden, dass sich unter der Therapie mit Pembrolizumab ein deutliche verlängerte Überlebensrate im Vergleich zur platinbasierten Chemotherapie ergibt. (28)

2 Ziele

Ziel dieser Arbeit war die Generierung von Fusions-Antikörpern mit spezifischer Bindung eines transplantierten Organes und inhibitorischer Wirkung auf T-Zellen in unmittelbarer Transplantatnähe.

Die angestrebte Bindestelle für die Antikörper sind MHCI oder II Komplexe. Durch die Bindung der Rezeptoren sollen diese maskiert werden, so dass eine Erkennung und Bindung durch T-Zellen erschwert wird.

Des Weiteren sollte die extrazelluläre Domäne von PD-L1 oder PD-L2 an die Antikörper angehängt werden, wodurch eine Down-Regulation von T-Zellen in unmittelbarer Nähe möglich wäre. Durch die niedrigaffine Bindung zwischen PD-1 und PD-L1/2 soll keine generelle Inhibition und Down-Regulation von T-Zellen verursacht werden.

Die Fusions-Antikörper wurden als chimäre Antikörper konstruiert mit spezifischer Bindung an Rezeptoren der Mauslinie C57/BL/6, um eine in vitro und in vivo Testung im Mausmodell zu ermöglichen. Eine Translation auf humane Bindearme soll nach abgeschlossener Testung erfolgen.

Die entwickelten Fusions-antikörper werden im Folgenden als CAT_i bezeichnet, was für Checkpoint Activating T-cell Inhibitor steht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Wenn nicht explizit anders angegeben wurden alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien bei Merck, Carl Roth oder Sigma Aldrich erworben. Restriktionsenzyme wurden bei New England Biolabs oder Fermentas gekauft, die Zellkulturmedien bei Thermo Fischer und ATCC, andere Zellkulturmaterialien bei Sarstedt.

3.1.1 E. coli Stamm

Zur Klonierung und Expression rekombinanter Proteine wurde der E. Coli Stamm „XL1-Blue“ verwendet, erworben bei der Firma Stratagene. Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)].

3.1.2 Zelllinien

Tabelle 1: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Firma
AF688.5.3 (ATCC® HB158™)	ATCC
AF6-120.1.2 (ATCC® HB-163™)	ATCC
Expi293F™	Thermo Fisher Scientific
EG7	Zur Verfügung gestellt von Sebastian Kobold, erworben von DSMZ
B3Z	Zur Verfügung gestellt von Sebastian Kobold
MOLM-13	Zur Verfügung gestellt von Sebastian Kobold

3.1.3 Vektoren

Tabelle 2: Vektoren, die zur Proteinexpression verwendet wurden

Vektor	Firma
pFUSE-CHlg-mG2a	Invivogen
pFUSE2-CLlg-mK	Invivogen
pFUSE-CHlg-hG1	Invivogen

pFUSE-CLIg-hK	Invivogen
pSecTag2/Hygro C	Life Technologies

Tabelle 3: Im Rahmen dieser Arbeit generierte Expressionsvektoren

Name	Enthaltene Sequenzen	Tag
RS046: HB158 VL auf human pFUSE light chain with Hybridoma leader sequence	α H2- κ B-VL	
RS47: HB158 VH auf human pFUSE heavy chain IgG1 with Hybridoma leader sequence	α H2- κ B-VH	
RS55: HB158 VL Bindekopf + mPD-L1ex @N-Terminus auf hpFUSE CLIg mk, Hybridoma leader sequence, g4s4 linker	α H2- κ BVL/mPD-L1ex	
RS57: HB158 VL Bindekopf + mPD-L2ex @N-Terminus auf hpFUSE CLIg mk, Hybridoma leader sequence, g4s4 linker	α H2- κ BVL/mPD-L1ex	
RS40 Fc Tag IgG1 mPD-L1 scFV	mPD-L1ex (IgG+IgV-fold)	Fc
RS41 Fc Tag IgG1 mPD-L2 scFV	mPD-L2ex (IgG+IgV-fold)	Fc
RS48 mPD-L1 Ig-like V-type in pSec (FC-Tag)	mPD-L1ex IgV-fold	Fc
RS49mPD-L2 Ig-like V-type in pSec (FC-Tag)	mPD-L2ex IgV-fold	Fc

3.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion International AG produziert und erworben.

Tabelle 4: Zur Klonierung verwendete Primer

Name	Beschreibung	Sequenz
RS001	mPD-L1ex_for_N_L	CCACTGGTGACGCGTTTACTATCACGGCTCC AAAGG
RS002	mPD-L1ex_rev_N_L	CATCTGAACATCCAGTTCTGGGATGATCAG CTCC
RS003	CLIg_mPD-L1_rev_N	GATAGTAAACGCGTCACCAGTGGAACCTGG AACC
RS004	CLIg_mPD-L1_for_N	CCCAGAACTGGATGTTTCAGATGACACAGAG C
RS005	mPD-L1ex_for_C_L_linker	ggaggatctggcggcgccgctctggaggcggaggtctGCGTT TACTATCACGGCTCC
RS006	mPD-L1ex_rev_C_L	CCTTTGTCTCTACAGTTCTGGGATGATCAGC TCC
RS007	CLIg_mPD-L1_rev_C_linker	ccgccgcgcgcagatcctcctcctccagaaccaccaccACAC TCATTCTGTTGAAGCTC
RS008	CLIg_mPD-L1_for_C	CCCAGAACTGTAGAGACAAAGGTCCTGAGA GC
RS009	(L234A, L235A) for	CCATGCAAATGCCCAGCACCTAACGCCGCG GGTGGACCATCCGTCTTCATC
RS010	(L234A, L235A) rev	GATGAAGACGGATGGTCCACCCGCGGCGTT AGGTGCTGGGCATTTGCATGG
RS013	mut P329G for	GCAAGGTCAACAACAAAGACCTCGGAGCGC CCATCGAGAGAACCATC
RS014	mut P329G rev	GATGGTTCTCTCGATGGGCGCTCCGAGGTCT TTGTTGTTGACCTTGC
RS097	mPD-L1ex FCTag for	catggcgGCAGCGTTTACTATCACGGCTCCAAA GG
RS098	mPD-L1ex FCTag rev	ccgaggccGACAGTTCTGGGATGATCAGC
RS099	mPD-L1ex FCTag backbone for	CATCCCAGAACTGTCggcctcgggggccg
RS100	mPD-L1ex FCTag backbone rev	GATAGTAAACGCTGCcgccatggcggctgg
RS101	mPD-L2ex FCTag for	ccatggcgGCACTGTTTCACAGTGACAGCC
RS102	mPD-L2ex FCTag rev	ccgaggccGACCAGGTTCTGGGCACCTTGG
RS103	mPD-L2ex FCTag backbone for	CAGAACCTGGTCggcctcgggggccg
RS104	mPD-L2ex FCTag backbone rev	CTGTGAACAGTGCcgccatggcggctgg
RS121	HB158 VL auf human pFUSE LC LSHCL for	CGGTgcCACCATGGTATCCACACCTCAG
RS122	HB158 VL auf human pFUSE LC LSHCL rev	GCAGCCACCGTCTTCAGTTCCAGC
RS123	human pFUSE HB158 VL auf LC LSHCL for	GGAAGTGAAGACGGTGGCTGCACCATCTG

RS124	human pFUSE HB158 VL auf LC LSHCL rev	GGATACCATGGTGgcACCGGTGATCTC
RS125	HB158 VH auf human pFUSE IgG1 HC LSHCL for	CGGTGCCACCATGGACTCCAGGCTC
RS126	HB158 VH auf human pFUSE IgG1 HC LSHCL rev	GGTGCTAGCAGCAGACACTGTGACCAG
RS127	human pFUSE IgG1 HB158 VH HC LSHCL for	CAGTGTCTGCTGCTAGCACCAAGGGCCCAT C
RS128	human pFUSE IgG1 HB158 VH HC LSHCL rev	GGAGTCCATGGTGGCACCGGTGATCTCAG
RS129	mPD-L1 IGV rev in pSec	ccgaggccGACGTGATTCGCTTGTAGTCC
RS130	pSec for mPD-L1 IGV	GCGAATCACGTCggcctcgggggcc
RS131	mPD-L2 IGV for in pSec	ccatggcgGCATTCACAGTGACAGCC
RS132	mPD-L2 IGV rev in pSec	ccgaggccGATTTACGGTCAGGTAC
RS133	pSec for mPD-L2 IGV	GACCGTGAAATCggcctcgggggccgg
RS134	pSec rev mPD-L1 IGV	CACTGTGAATGCcgccatggcggctgg
RS135	insert for	CTCCAGAGGTGCGTTTACTATCACGGCTCC
RS136	insert rev	gccgccgccagatcctcctcctccagaaccaccaccaccCAG TTCTGG
RS137	vector for	ggaggatctggcgggcggtctggaggcggaggtctGATAT TCTGCTG
RS138	vector rev	GTAAACGCACCTCTGGAGGCTGGAATCC
RS139	insert rev	cgcgccagatcctcctcctccagaaccaccaccaccCGTGATT CGCTTG
RS140	insert for	CTCCAGAGGTCTGTTCACAGTGACAGCC
RS141	vector for	gccgccgccagatcctcctcctccagaaccaccaccaccCCAGG TTCTGGGCAC
RS142	vector rev	CTGTGAACAGACCTCTGGAGGCTGGAATCC
RS143	insert for	CCTCCAGAGGTTTCACAGTGACAGCCCCTA AAGAGG
RS144	insert rev	ccgccgccagatcctcctcctccagaaccaccaccaccTTTCAC GGTCAGGTAC
RS145	vector rev	GTCACGTGAAACCTCTGGAGGCTGGAATC C

Tabelle 5: Zur Sequenzierung verwendete Primer

Name	Sequenz
LP23	TCTGCGCCGTTACAGATCCA
LP87	ATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAAC

3.1.5 Aminosäuresequenzen

Tabelle 6: Aminosäuresequenzen von Bindungsköpfen und Liganden

Name	Sequenz
Muriner Anti MHCI (H2k-b) Bindekopf Leichte Kette	DILLTQSPAILSVRPGERVSFSCRASQSLGTSIHWYQQ RTDGSPRLLIKAYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSV ESEDIADYYCQQSNSWPITFGAGTKLELK
Muriner Anti MHCII (IAb) Bindekopf Leichte Kette	DIVLSQSPSSLAVSVGEKVTMSCRSSQSLLNSRTRKN FLAWYQQKPGQSPKLLIWASTRDSGVPNRFTGRGS GTDFALTISVQAEDLAVYYCKQSYDLYTFGGGTKL EIK
Anti MHCI (Typ H2k-b) Bindekopf Schwere Kette	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHW VRQAPEKGLEWVAYISSGSNTIYYADTVKGRFTISR DNPKNLTLFLQMTSLRSEDAMYYCALTTGSWFAYW GQGTLVTVSA
Anti MHCII (Typ IAb) Bindekopf Schwere Kette	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFTFTNYWMN WVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYAIYYAESVKGRF TISRDDSKSSVFLQMNNLRAEDTGIYFCTRHYGSTYG WYFDVWGAGTTVTVSS
Extrazelluläre Domäne des murinen PD-L1	AFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLA LVVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRAS LPKDQLLKGNAAALQITDVKLQDAGVYCCIIISYGGAD YKRITLKVNPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYP EAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSS LRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIPELPAH PPQNRTH
Extrazelluläre Domäne des murinen PD-L2	LFTVTAPKEVYTVDVGSSVSLECFDRRECTELEGIRA SLQKVENDTSLQSERATLLEEQLPLGKALFHIPSVQV RDSGQYRCLVICGAAWDYKYLTVKVKASYMRIDTRIL EVPGTGEVQLTCQARGYPLAEVSW QNVSVPAANTSHIRTPEGLYQVTSVLRLLKPQPSRN

	FSCMFVNAHMKELTSIIDPLSRMEPKVPRTW
Humaner IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

3.1.6 Kommerzielle Antikörper

Tabelle 7: Kommerzielle Antikörper, die für FACS Analyse und Western Blots verwendet wurden

Antigen	Fluorophor	Reaktivität	Isotyp	Klon	Firma
Kappa light chain	HRP	human	Goat	n.d.	Bethyl
IgG Fc	HRP	human	rabbit	n.d.	Thermo Scientific
IgG Fc	FITC	human	Mouse IgG2a, kappa	HP6017	Biolegend
IgG Fc	FITC	murin	Rat polyclonal IgG	Poly4060	Biolegend
PD-1	FITC	murin	Rat IgG2a, kappa	29F.1A12	Biolegend

3.1.7 Puffer und Medium

Tabelle 8: Standardmäßig verwendete Puffer für biochemische Methoden und Zellkultur

Puffer	Inhaltsstoffe
10x PBS (1l)	80g NaCl, 2g KCl, 14.4g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2g KH ₂ PO ₄ (pH 7.4)
1x PBS-T (1l)	100ml 10x PBS, 0.1% (v/v) Tween-20
1x Transferpuffer	25mM Tris, 192mM Glycin pH 8.3, 20% EtOH

Coomassie Färbung	50% Ethanol, 7% Essigsäure, 0,2% Coomassie Brilliant Blue R250
20x ECL Lösung	2M Tris (pH 8.5)
1x ECL Lösung (10ml)	10ml 20x ECL Lösung, 3µl H ₂ O ₂ , 25µl Cumarinsäure, 50µl Luminol
FACS Puffer	1% (v/v) FBS und 1x PBS
Waschpuffer	50mM TrisHCl (pH 7.0)
Neutralisationspuffer	1M Tris (pH 9.0)
Elutionspuffer	2.1g Zitronensäure in 90ml H ₂ O, x ml NaOH bis pH 3.0

Tabelle 9: Verwendetes Medium und Puffer für E.Coli

Medium	Inhaltsstoffe
LB Medium (1l)	10g bacto tryptone, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, 1.3ml NaOH
LB Agar (1l)	LB medium + 15g Agar

3.1.8 Technische Geräte

Tabelle 10: Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Aekta Purifier 10, Explorer, Basic, FPLC	GE Healthcare
Agarose Gelelektrophorese System	Bio-Rad
Amersham TM Imager 600	GE Healthcare
Zellkultur laminar flow	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Countess	Thermo Fisher Scientific
Guava Easy Cyte 6HT	Merck Millipore
HeraCell CO ₂ incubator	Thermo Scientific
Innova 44 shaker	New Brunswick Scientific
Inverted laboratory microscope Leica DM IL LED	Leica
Microplate reader Infinite M1000 Pro	Tecan
Mini-Trans Blot® electrophoretic transfer cell	Bio-Rad

Mr. Frosty Kühlbehälter	Thermo Fisher Scientific
Multitron Zellinkubator	Infors HT
Nanodrop ND-1000	Peqlab Biotechnologies GmbH
Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System	Thermo Fisher Scientific
pH-meter 766	Knick
Rotanta 460 RT Zentrifuge	Hettich
Sartorius Waage LE 22025	Sartorius AG
Sorvall RC6+ Zentrifuge	Thermo Scientific
T personal thermocycler	Biometra
Tischzentrifuge	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tycho NT.6	Nanotemper

3.1.9 Software

Tabelle 11: Verwendete Software

Name	Firma
Ape – A plasmid Editor version	M. Wayne Davis
Snapgene® version	GSL Biotech LLC
Graph Pad Prism version	GraphPad Software Inc.
InCyte Software version	Merck Millipore
FlowJo test version	BD
PyMOL Molecular Graphics System version	Schrödinger, LLC

3.2 Methoden

3.2.1 Antikörperdesign

Die Antikörper CAT_i1 und CAT_i2 wurden mit Hilfe der APE – A Plasmid Editor Software entworfen. Die Gensequenzen der VL und VH , sowie die „constant heavy“ (CH)-1-, CH2- und CH-3-Domäne, stammen aus der Sequenzierung von Antikörpern gegen H2-kb, welche von der

Hybridomzelllinie HB158 (ATCC) exprimiert werden. Hierfür wurden die aus Hybridomlinien gewonnenen Antikörper (siehe Kapitel 3.4.1) von dem kommerziellen Anbieter Absolute Antibody sequenziert. Nach Anpassung der Sequenzen für die spätere Expression im Hek-293-System (siehe Kapitel 3.4.3) wurden diese bei der Firma GeneArt käuflich erworben.

Das Backbone der Antikörper ist human, bestehend aus einer leichten Kette Typ kappa und einer schweren Kette Typ IgG1 und wurde bei Invivogen erworben. Am N-Terminus der leichten Kette befindet sich, verbunden durch einen (G₄S)₄-Linker, für CAT_i1 die extrazelluläre Domäne des murinen PD-L1 (mPD-L1_{ex}) und für CAT_i2 die extrazelluläre Domäne des murinen PD-L2 (mPD-L2_{ex}). Die Sequenzen für die extrazelluläre Domäne des murinen PD-L1 und PD-L2 wurde entsprechend der veröffentlichten Sequenzen verwendet (29).

3.2.2 Klonierung

Die angewandten Klonierungsmethoden, bestehend aus schnittstellenspezifischem Schneiden durch Restriktionsenzyme, Dephosphorylierung, anschließender Ligation und Gelelektrophorese, wurden nach nachfolgendem standardmäßigem Protokoll durchgeführt. (30) Kommerzielle Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet. Hierunter fällt die Isolation von Plasmid DNA aus E.coli XL-1 blue unter Verwendung des NucleoSpin® Plasmid EasyPure kits (MACHEREY-NAGEL) oder des QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen). Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin® Gel and PCR clean-up kit (MACHEREY-NAGEL) verwendet.

Die Korrektheit der DNA-Sequenzen wurde durch Sequenzierung bei Eurofins Genomics geprüft.

3.2.3 PCR und Mutagenese

Die cDNA-Sequenz für mPD-L1_{ex} wurde mittels PCR aus der cDNA von Fibroblasten aus Mäuseembryonen generiert. Die cDNA-Sequenz für mPD-L2_{ex} wurde mittels Gensynthese hergestellt (GeneArt) erworben.

Um neue Abschnitte in die Plasmid-DNA einzufügen oder vorhandene zu entfernen, sowie zur Punktmutation, wurde „Site-directed“ Mutagenese angewandt. Hierfür wurden zwei Primer genutzt, vom 3' und vom 5' Ende um die Mutation ausgehend und einer Länge zwischen 20 und 40bp, wobei die beiden sich um mindestens 20bp überlappten.

Für die PCR wurden standardmäßig 10-100ng der DNA-Vorlage mit 10µl Phusion Flash High-Fidelity PCR Master-Mix (Thermo Fisher Scientific) (2x), 1µl des ersten Primers (Verdünnung 1:10), 1µl des zweiten Primers (Verdünnung 1:10), 0,6µl DMSO und 6,4µl destilliertes Wasser in PCR-sample-Röhrchen pipettiert und vermischt. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

1. 95°C - 5 Minuten
2. 98°C - 1 Minute
3. 72°C - 30 Sekunden
4. 72°C - 2 Minuten
5. 29x Schritt 2 bis 4 wiederholen
6. 72°C - 10 Minuten
7. 16°C – Abkühlen

Anschließend wurde je 1µl DPN1 zum Vektorverdau zugegeben und bei 37°C im Hitzeblock inkubiert. Im nächsten Schritt wurde zu jedem PCR-Produkt je 5µl 6x-Ladungspuffer hinzugefügt, die Proben in ein 1%iges-Agarosegel aufgetragen und dieses für 30 Minuten an 100V Strom angeschlossen. Das Agarosegel wurde in einer UV-Kammer begutachtet und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten, um diese anschließend mit dem „Nucleo-Spin Gel and PCR-Purification Kit“ nach entsprechendem Protokoll des Herstellers aufzureinigen.

Als nächster Schritt folgte ein Gibson Assembly, wodurch die zwei entstandenen Anteile des Vektors fusioniert werden sollten. Hierfür wurden 7,5µl Gibson-Master-Mix mit entsprechenden Mengen des Vektors, bzw. der einzufügenden Sequenz, vermischt und bei 50°C im Hitzeblock für eine Stunde inkubiert.

Um sicher zu stellen, dass keine Immunantwort durch den F_C-Teil der Antikörper ausgelöst wird, wurden die gängigen Silencing-Punktmutationen P329G, L234A, L235A eingefügt. (31)

Die korrekte Assemblierung und Mutation wurde nach Transformation in *E. coli* (siehe Kapitel 1.3.1) durch eine Kolonie-PCR und DNA-Sequenzierung kontrolliert. Für die Kolonie PCR wurden einzelne Bakterienkolonien ausgewählt und als Template für die PCR verwendet.

Tabelle 12: Verwendete DNA-Sequenzen der variablen Regionen für leichte und schwere Ketten.

	DNA Sequenz
α - H2- κ B leichte Kette	ggcccagccggccatggcgGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAG CCATCCTGTCTGTGCGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTT CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCCTTGGCACAAGCATA CACTGGTATCAGCAAAGAACAGATGGTTCTCCAAGGC TTCTCATAAAATATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATC CCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATT TACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATT GCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCAA TCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
α - H2- κ B schwere Kette	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGC AGCCTGGAGGGTCCCGGAACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTCACTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTC GTCAGGCTCCAGAGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCGCATA CATTAGTAGTGGCAGTAATACCATCTACTATGCAGAC ACAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATC CCAAGAACACCCTGTTCCCTGCAAATGACCAGTCTAAG GTCTGAGGACACGGCCATGTATTATTGTGCACTTACG ACGGGGTCCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTC TGGTCACTGTCTCTGCAtcggcctcggggggcc
α - IAb leichte Kette	ggcccagccggccatggcgGACATTGTGCTGTGCAGTCTCCAT CCTCCCTGGCTGTGTGTCAGTAGGAGAGAAGGTCAGTAT GAGCTGCAGATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGA ACCCGAAAGAACTTCTTGGCTTGGTACCAGCAGAAAC CAGGGCAGTCTCCTAAACTCCTGATCTACTGGGCATC CACTAGGGATTCTGGGGTCCCTAATCGCTTCACAGGC AGGGGATCTGGGACAGATTTTCGCTCTCACCATCAGCA GTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAA ACAATCTTATGATCTGTACACGTTTCGGAGGGGGGACC AAGCTGGAAATAAAA
α - IAb schwere Kette	GAGGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGC AACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCCTGTGTTGCCTCT GGATTCACTTTCTACTAACTATTGGATGAACTGGGTCCG CCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAATGGGTGCTGAA ATTAGATTGAAGTCTAATAATTATGCAATATATTATGC GGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTACCATCTCAAGAGAT GATTCCAAAAGTAGTGTCTTCCTGCAAATGAACAAC TAAGAGCTGAAGACACTGGCATTACTTCTGTACCAG GCACTACGGTAGTACCTACGGCTGGTACTTCGATGTCT GGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAtcggcctc ggggggcc

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Transformation in E.coli

Nach langsamem Auftauen der XL-1 blue E.coli-Bakterien in Eppendorfgläsern wurden diese mit der jeweiligen Vektor-DNA vermischt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit auf Eis, gefolgt von 45 Sekunden Hitzeschock bei 42°C, erfolgte eine erneute kurze Ruhephase von 2 Minuten auf Eis. Nach der Zugabe von 600µl vorgewärmten LB-Agar pro Eppendorfglas wurden die E.coli mit der Vektor-DNA bei 37°C für eine Stunde im Schüttler inkubiert und im Anschluss bei 3000g für zwei Minuten zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet im verbliebenen Medium resuspendiert und anschließend auf LB-Agar-Platten mit vektorentsprechendem Antibiotikazusatz (siehe Tabelle 12) ausplattiert. Die benetzten Platten wurden im Brutschrank bei 37°C über Nacht belassen, die Kolonien im Anschluss ausgewertet und auf Richtigkeit der Klonierung durch Sequenzierung geprüft. Hierfür erfolgte die Durchführung von Kolonie-PCRs und anschließende DNA Sequenzierung.

Tabelle 13: Antibiotika, Konzentration

Antibiotika	Konzentration
Zeocin	25 µg/ml
Blastizidin	100 µg/ml
Ampicillin	100 µg/ml

3.4 Zellkultur

3.4.1 Antikörpergewinnung aus Hybridomzelllinien HB158 und HB162

Die Hybridomzelllinien HB158 und HB162 wurden gemäß Herstellerangaben und in speziellem Medium (ATCC®) in Kultur genommen. Nachdem die Zellen eine stabile Wachstumsrate und Viabilität von über 90% erreichten, wurde der Überstand geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C in Eppendorfgläsern gelagert. Die Zellzahl und Viabilität wurde durch Färbung mit Trypanblau und händischer Auszählung in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

Die Zellen wurde an Absolute Antibody übermittelt und eine Sequenzanalyse der Antikörper durchgeführt.

3.4.2 Splenozyten

Zur Gewinnung von murinen Splenozyten wurden Milzen von Mäusen der Linie C67Bl/6 verarbeitet, diese wurden freundlicherweise durch die AG Bazin zur Verfügung gestellt. Um eine Zellsuspension herzustellen, wurde die Milz einer Maus entnommen und in einem 50ml Falcon gekühlt auf Eis transportiert. Im Anschluss wurde das Gewebe mit Hilfe eines Stempels einer 2ml Spritze durch ein 100µm Zellsieb gedrückt. Dann wurde das Zellsieb mit 10-15ml PBS gespült, um verbliebenes Gewebe aus dem Sieb zu lösen. Das gesiebte Gewebe wurde in einem 50ml Falcon aufgefangen und nun bei 400g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1-5ml Erythrolyse-Puffer hinzugegeben. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit und ausgiebigem Mischen mit dem Vortex-Gerät wurde die Erythrolyse durch Zugabe von 10ml PBS gestoppt. Die Suspension wurde erneut durch das Zellsieb gegeben, erneutes Nachspülen mit 5ml PBS und Zentrifugation. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 5-10ml PBS resuspendiert. Im Anschluss konnten die Splenozyten gezählt und weiterverwendet oder eingefroren werden.

3.4.3 Rekombinante Proteinexpression in HEK293-basiertem Expressionssystem

Zur Expression der Antikörper CAT_i1 und CAT_i2 und deren Vorgänger wurde das Expi-293F-System genutzt. Am Tag vor der geplanten Expression wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml verdünnt.

Expi293™ (Thermo Fischer Scientific) stammen von HEK293-Zellen ab und wurden als Suspensionskultur in Expi293™-Expressionsmedium in Erlenmeyerkolben (Corning) bei 125rpm im 37°C-Schüttelinkubator in Kultur gehalten. Die Kultur wurde in einer Konzentration zwischen $0,5-6 \times 10^6$ Zellen/ml gehalten. Die Auszählung und Bestimmung der Viabilität erfolgte ebenfalls durch Färbung mit Tryptanblau und eine automatische Auszählung mittels Countess Cell Counter (Thermo Fisher Scientific).

Für eine Testexpression wurden je 700µl der Zellen am Tag der Expression in eine 24-well-Platte gegeben. In Eppendorfgefäßen wurde insgesamt je 0,7µl mRNA (variables Verhältnis von schwerer zu leichter Kette für Antikörper) mit 35µl OptiMEM vermischt. Separat wurden 1,9µl ExpiFectamine293 mit weiteren 35µl OptiMEM in ein Eppendorfgefäß gegeben und 5

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die verdünnte mRNA mit dem verdünnten ExpiFectamine vermischt, weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt zu einem mit Zellsuspension befülltem Well gegeben und wiederum vorsichtig mit der Pipette gemischt.

Die transfizierte Platte wurde dann im Schüttelinkubator bei 37°C belassen. Nach 18-24 Stunde wurden 3,5µl Enhancer I und 35µl Enhancer II zu jedem Well gegeben und die Platte für weitere 4-6 Tage im Schüttelinkubator inkubiert.

Für eine Expression in höherem Volumen wurden die Mengen verhältnismäßig angepasst und Zellkulturflaschen statt Well-Platten verwendet.

3.4.4 T-Zell-Linien für FACS und ADCC – EG7

Für die spätere Analyse der spezifischen Bindung der Antikörper CAT_i1 und CAT_i2 wurde die T-Zell-Linie EG7 gewählt, die von Black-6-Mäusen abstammt und deshalb das H2-κB- und I-Ab-Molekül und zusätzlich den PD-1-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Diese wurde freundlicherweise von Sebastian Kobold zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wurde nach dem Auftauen als Suspensionskultur in RPMI mit Zugabe von 10% FBS und 0,1% HEPES in einer Konzentration von $0,2 \times 10^6$ /ml in Kultur gehalten.

3.5 Protein-biochemische Methoden

3.5.1 Proteinaufreinigung mit Protein A

Die Proteinaufreinigung mit Protein A wurde nach einem Standardprotokoll ausgeführt. Die Zellsuspension der Expi-293-Zellen wurden in 50ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1600g für 3 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand in neue 50ml Falcon-Röhrchen geschüttet, 500µl Protein-A-Beads hinzugegeben und im Rotator über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Falcon-Röhrchen bei 3000rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand in neue Falcon-Röhrchen abgegossen. Die Aufreinigungssäule wurde mit 500µl Waschpuffer equilibriert. Im ersten Schritt wurden die Protein-A-Beads ohne Zusatz in die Säule gegeben und der Durchlauf in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Im Weiteren wurden 500µl Waschpuffer zur Säule gegeben und wiederum der Durchlauf in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Dieser Schritt wurde drei weitere Male wiederholt. Im letzten Schritt wurde Elutionspuffer hinzugegeben und der Durchlauf wurde zur Neutralisation des pH-Wertes (pH=7) mit Neutralisationspuffer versetzt. Nun wurde ein SDS-PAGE mit den

Fraktionen aus Waschung und Elution wie unter 3.7.2 beschrieben durchgeführt, um zu ermitteln, in welchen sich Proteinanteil befand und um die Reinheit zu überprüfen. Die ausgewählten Fraktionen wurden daraufhin in einem Konzentrator zusammengeführt und auf ein Volumen von circa 500µl reduziert und konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde durch Absorption bei 280nm mit dem Nanodrop ND-1000 (Peqlab Biotechnologies) gemessen. Im Anschluss wurden die Proteine in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.5.2 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Evaluation der Proteine wurde die denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese angewandt. Hierzu wurden je 20µl jeder Protein-Fraktion mit je 20µl 4x-Ladungspuffer vermischt. Als Nächstes wurden die Proben bei 95°C für 5 Minuten im Hitzeblock denaturiert und dann zentrifugiert, bevor das SDS-Gel mit den Fraktionen beladen wurde. Für jedes Gel wurde eine Protein-Größenleiter (Page-Ruler Unstained oder Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) und eine Positiv-Kontrolle zugefügt. Für die SDS-Page wurden 4-20% Bis-Tris Gele des RunBlue SDS-PAGE Gel Systems (Expedeon) genutzt. Die Gelelektrophorese wurde mit 120V für 10 Minuten gestartet und die Spannung auf 160V erhöht bei einer Laufzeit von insgesamt einer Stunde.

Im Anschluss wurde das SDS-Gel entweder mit Coomassie Brilliant Blue-Färbung für mindestens 30 Minuten gefärbt und in Wasser entfärbt oder für Western Blots verwendet.

3.5.3 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Die Größenausschluss-Chromatographie dient der genauen Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Die Proteine konnten in Verwendung einer Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare) getrennt werden. Anhand des Chromatogramms können Fraktionen ausgewählt werden, die Protein enthalten. Diese Fraktionen wurden in einem weiteren SDS-Gel analysiert und anschließend gepoolt und konzentriert.

Anschließend wurden sie in ein Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.5.4 Western Blot

Ein Western Blot wurde zum Proteinnachweis einer Test- oder Ernte-expression genutzt.

Zuerst wurde ein SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.7.2) bis zur Färbung durchgeführt. Das Gel wurde nun in Transferpuffer equilibriert bevor dieses geblottet wurde. Hierfür wurden vorgefertigte Western-Blot-Sandwiches (BioRad) verwendet.

Die PVDF-Membran wurde für fünf Minuten in ausreichend PBST bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend für eine Stunde in PBST mit 3% Milchpulver geblockt. Es folgte ein erneuter Waschschrift. Als Nächstes wurden entsprechende Anti-Leichte-Kette-HRP-Antikörper und Anti-Schwere-Kette-HRP-Antikörper in je 10ml PBST mit 3% Milchsäure in Verdünnung nach Herstellerangabe zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Darauf folgten drei 10-minütige Waschschriffe in PBST. Zuletzt wurde die PVDF-Membran in 10ml Entwicklerlösung eingelegt und die Chemolumineszenz im digitalen Filmentwickler (Amersham™ Imager 600, GE Healthcare) gemessen.

3.6 Durchflusszytometrie

3.6.1 Detektion von PD-1 auf Black-6-T-Zell-Linien

Zur in-Vitro-Testung der Antikörper CAT₁ und CAT₂ wurde eine von Black-6-Mäusen abstammende T-Zell-Linie benötigt, die PD-1 auf ihrer Oberfläche exprimiert. Hierfür kamen mehrere Zelllinien in Frage, EG7 und B3Z konnten freundlicherweise von Kolleg: innen zur Verfügung gestellt werden. Um ihre PD-1 Expression zu analysieren wurde die Zelllinien in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte gegeben, insgesamt wurden je 3 Wells mit EG7 und B3Z befüllt, jeweils ein Well für eine ungefärbte Kontrolle, für die Isotypenkontrolle und für die Färbung mit einem Anti-PD-1 Antikörper (Biolegend). Als nächstes wurden die Platten bei 120g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette entfernt und die entstandenen Zell-Bodensätze entweder in FACS-Puffer (200µl) (Ungefärbte Kontrolle), Isotyp-Antikörper (30µl) oder Anti-PD-1-Antikörper (30µl) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten im Kühlschrank. Die Wells wurden auf 200µl mit FACS-Puffer aufgefüllt und die Platten erneut bei 120g für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200µl FACS-Puffer resuspendiert, um die noch ungebundenen Antikörper abzuwaschen und den Färbeprozess zu beenden. Im Anschluss wurde mit dem Guava easyCyte 6HT Gerät (Merck, Millipore) gemessen. Die Verhältnisse der Mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) wurde aus der medianen Fluoreszenzintensität zum Median der Isotypkontrolle errechnet.

3.6.2 Bindungs-FACS und Dissoziationskonstante „ K_D “

Um die hochaffine Bindung der Antikörper-Konstrukte CAT_i1 und CAT_i2 an H2-kb zu evaluieren erfolgte eine Durchflusszytometrie. Der Vorläufer-Antikörper CAT, der keine N-terminal angehängten inhibitorische Komponenten besitzt, wurde zur Differenzierung zwischen Bindung an H2-kb und Bindung an den PD-1-Rezeptor genutzt.

Für das einfache Bindungs-FACS wurden 2×10^5 Zellen der Linie EG7 mit je $15 \text{ mg}/\mu\text{l}$ in $30 \mu\text{l}$ in FACS-Puffer gelöstem Antikörper CAT, CAT_i1 oder CAT_i2 für 30 Minuten bei -4°C inkubiert. Darauf folgte ein Waschschriff mit je $200 \mu\text{l}$ FACS-Puffer und der Zellbodensatz im Anschluss mit einem FITC Anti-human-IgG-FC Antikörper (BioLegend) in der Verdünnung 1:100 resuspendiert und erneut für 30 Minuten bei -4°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriffen wurde mit dem Guava easyCyte 6HT Gerät (Merck, Millipore) gemessen.

Um die Bindung der Hybridomantikörper an Splenozyten zu verifizieren, wurden 1×10^5 Splenozyten, entweder der Mauslinie CD57/Bl6 oder BALB/c, in 100 ml FACS Puffer suspendiert. Die Hybridomantikörper wurden mit dem Zenon Mouse IgG2a Labeling Kit gemäß der Herstellerangaben markiert. Der markierte Hybridomantikörper wurde mit den Splenozyten für 30 Minuten bei Raumtemperatur oder -4°C im Dunklen inkubiert, zwei Mal mit PBS gewaschen und gemessen .

Für die Bestimmung des „ K_D “-Wertes wurde das gleiche Versuchsprotokoll genutzt. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von $0,1\text{-}15 \mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet.

Es handelt sich um keine echte Dissoziationskonstante K_D , da alle Antikörper zwei Bindestellen besitzen und damit kein 1:1 Verhältnis zwischen Rezeptoren und Liganden besteht.

3.7 In Vitro Assays

3.7.1 Temperaturstabilität

Zur Analyse, ob die Antikörper CAT_i1 und CAT_i2 bei Körpertemperatur stabil sind, wurden je 5 Proben à $7 \mu\text{l}$ in Eppendorfgefäßen bei 37°C inkubiert und an Tag 0, 3, 6, 10 und 14 entnommen und eingefroren. Nach 14 Tagen wurden alle Proben aufgetaut und eine SDS-PAGE durchgeführt.

3.7.2 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)

Ob eine erfolgreiche Silencing-Mutation erfolgen konnte und dementsprechend keine Immunantwort durch den FC-Teil der Antikörper CAT_i1 und CAT_i2 ausgelöst wird. Die Fähigkeit ADCC auszulösen, wurde in einem Assay überprüft.

Als Zielzellen für CAT_iControl, CAT_i1 und CAT_i2 wurde die Linie EG7 verwendet, für die indirekte Positivkontrolle mit LP47 (α CD33-Antikörper) MOLM-13-Zellen. Humane NK-Zellen konnten aus PBMCs gewonnen werden, diese wurden freundlicherweise von der AG Subklewe, LP47 wurde freundlicherweise von Laia Pascual-Ponce (AG Hopfner), MOLM-13-Zellen von DSMZ zur Verfügung gestellt.

Die Zielzellen wurden auf 1×10^6 /ml in RPMI mit 10% FBS verdünnt und mit 1ml Calcein für 30 Minuten im Hitzeblock inkubiert und dadurch markiert. Danach wurden die Zielzellen 3-mal in Medium gewaschen und nun auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml verdünnt. Die NK-Zellen wurden gezählt und auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml verdünnt.

Für den Versuchsansatz wurden eine 96-V-Well-Platte verwendet und Triplette aus je 100 μ l RPMI mit 50 μ l markierten Zielzellen (10.000 Zellen/well), 50 μ l NK-Zellen (20.000 Zellen/well) und 10nM des jeweiligen Antikörpers in 2 μ l Volumen verwendet.

Als Kontrollen wurden folgende Kombinationen je als Triplette angesetzt:

1. BG+NK: 100 μ l RPMI+10%FBS + 50 μ l markierte Zielzellen + 50 μ l NK-Zellen
2. BG-NK: 150 μ l RPMI+10%FBS + 50 μ l markierte Zielzellen
3. MAX-Lyse: 100 μ l RPMI+10%FBS + 50 μ l markierte Zielzellen + 50 μ l RPMI+10%FBS +10% Triton.

Die Platte wurde für 4 Stunden bei 37°C inkubiert, und anschließend bei 400g für fünf Minuten zentrifugiert. 100 μ l des Überstandes jedes Wells wurden vorsichtig in eine schwarze 96-well-Platte transferiert und die Lyse durch die Messung der Fluoreszenz des freigesetzten Calcein aus lysierten Zielzellen im Microplate reader Infinite M1000 Pro (Tecan) ausgelesen.

Die spezifische Lyse wurde im Anschluss durch folgende Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse} = \frac{\text{Fluoreszenz (Probe)} - \text{Fluoreszenz (BG + NK)}}{\text{Fluoreszenz (MAX Lyse)} - \text{Fluoreszenz (BG)}} \times 100$$

Die Ergebnisse wurden in einer Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt.

3.7.3 Tycho

Zur Messung der Temperaturstabilität wurden je 10µl der aufgereinigten Antikörper in Glaskapillaren gegeben und im Tycho (Nanotemper) ausgewertet. Diese Methode wurde unter anderem verwendet, um zu evaluieren, ob sich die Proteinqualität durch Einfrieren und Auftauen veränderte und wurde dementsprechend vor der Verwendung der generierten Antikörper in anderen Versuchen angewandt.

3.8 Statistische Analyse

Zur Erstellung von Graphen und statistischen Analyse wurde die GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc.) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Design der Antikörper

Ziel war die Expression mehrerer Antikörper mit hochaffiner, spezifischer Bindung des Major Histocompatibility Komplexes (MHC) I oder des MHCII und einer niedrigaffinen Bindung an PD-1. Die Bindung der MHC soll eine Maskierung der spenderspezifischen und damit primär empfängerfremden Rezeptoren bewirken. Ein gerichteter Angriff auf PD-1 exprimierenden Zellen sollte durch die niedrigaffine Bindung nicht erfolgen, lediglich T-Zellen in unmittelbarer Nähe der bereits gebundenen Antikörper sollen durch die Aktivierung des Checkpoints inhibiert werden.

Die Transplantation verschiedener Organe von C57BL/6 Mäusen auf Balb/c Mäuse ist ein gängiges Modell (32). Es wurde im Hinblick auf spätere Versuche die Moleküle H2-κB und IAb, abstammend von C67BL/6, als Zielangriffspunkte gewählt. Dementsprechend mussten die variablen Regionen der neuen Fusionsantikörper jenen entsprechen, die an H2-κB und IAb binden. Solche Antikörper werden von den Hybridomzelllinien HB158 und HB163 (ATCC) exprimiert.

Die DNA-Sequenzierung der Hybridom-Antikörper wurde bei der Firma Absolute Antibody durchgeführt. Nach Optimierung der ursprünglichen Sequenzen (Tabelle 12) für die Expression im Expi293™-System, wurden diese bei Gene-Art erworben, um sie für die Klonierung verwenden zu können.

Zur Vereinfachung der Entwicklung wurde primär der Entwurf zur Bindung an H2-κB verfolgt. Wir entwickelten somit die Checkpoint-Activating-T-Cell-Inhibitor-Antikörper (CAT_i). Die angehängte T-Zell-inhibitorische Komponente entspricht bei CAT_i1 _mPD-L1_{ex}, und bei CAT_i2 _mPD-L2_{ex}. Beide sind jeweils durch einen (G₄S)₄ Linker mit dem N-Terminus des Antikörpers verbunden, wodurch eine Bindung an H2-κB nicht beeinträchtigt und gleichzeitig Flexibilität gewährleistet wird.

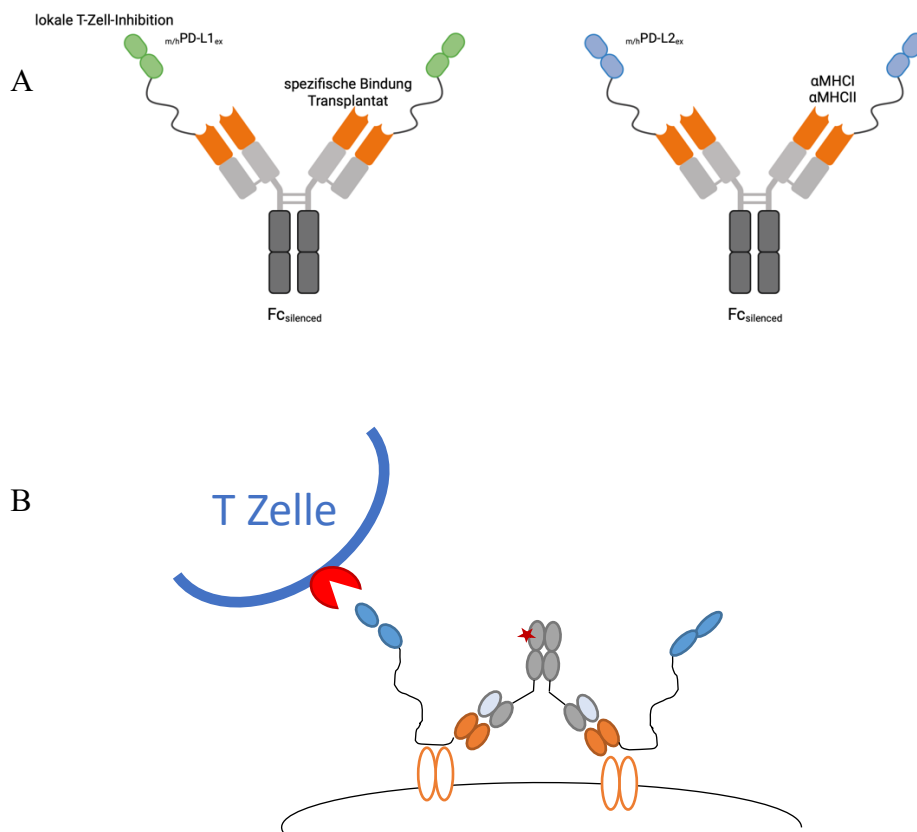


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Antikörperformate.

A: Antikörper der Klasse IgG. Der Fc-Anteil (dunkelgrau) wurde durch Punktmutationen gesilenced. Angehängt sind immunsuppressive Komponenten durch G4S4 Linker am N-Terminus der variablen Domäne des Antikörpers, im Beispiel links die extrazelluläre Domäne des murinen PD-L1 und rechts des murinen PD-L2. In orange dargestellt ist die Fv-Domäne, die der Bindungsstelle des Antikörpers entspricht. Hier soll im Mausmodell MHC Klasse I oder II von C57 Bl/6 Mäusen gebunden werden.

B: Vereinfachte Darstellung der simultanen Bindung an das Transplantat und einer T-Zelle via PD-L1 oder PD-L2

Zur Evaluation dieses Bindungsverhaltens wurden CAT_i1 und CAT_i2 mit einem Kontroll-Antikörper ohne N-terminalen Anhang verglichen, welcher im Folgenden CAT_iControl genannt wird.

Als inhibitorische Komponenten wurden, wie bereits erwähnt, die extrazellulären Domänen des murinen PD-L1 und PD-L2 gewählt. Beide bestehen aus einer Ig-like-V-type und einer Ig-like-C2-type Domäne, wobei lediglich der Ig-like-V-fold an der Rezeptorbindung mit PD-1 beteiligt ist(17) (siehe Abbildung 2). Es wurden sowohl die vollen extrazellulären Domänen sowie nur die jeweiligen Ig-like-V-folds mit einem FC-Tag exprimiert.

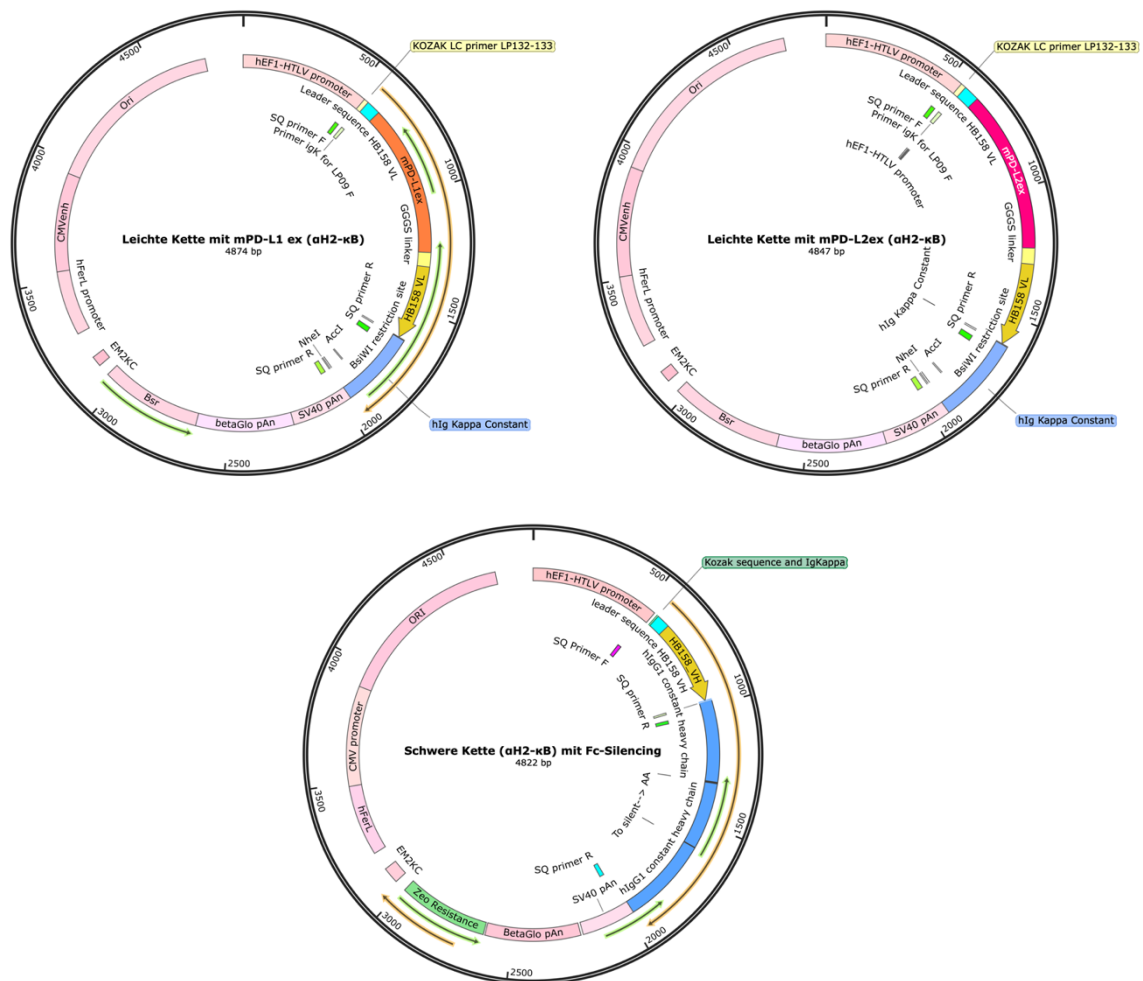


Abbildung 6: Vektorkarten der schweren und der leichten Ketten.

- A) Vektormappe der leichten Kette mit $mPD-L1_{ex}$
- B) Vektormappe der leichten Kette mit $mPD-L2_{ex}$
- C) Vektormappe der schweren Kette IgG1 mit PG-LALA Silencing Mutation

4.2 Generierung der Antikörper

4.2.1 Expression und Proteinreinigung

Alle Proteine wurden nach beschriebenem Protokoll im Expi293F™-System exprimiert und im Anschluss gereinigt. Nachstehend sind exemplarische Aufreinigungen von CAT_{iControl}, CAT_{i1} und CAT_{i2} dargestellt (Abbildung 7).

Hierbei ergab sich für alle exprimierten Antikörper ein höheres molekulares Gewicht als das theoretisch errechnete. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die starke Glykosylierung von PD-L1

und PD-L2 zurückzuführen (33). Das molekulare Gewicht der schweren Ketten zeigte eine konstante Größe zwischen 50 und 60 kDa. Das Gewicht der leichten Ketten erhöhte sich nach Anhängen von $mPD-L1/2_{ex}$ am N-Terminus signifikant auf ca. 70 kDa (siehe Abbildung 8 (D-I)). Die SDS-PAGE der Aufreinigung zeigte, dass die Antikörper sich vor allem in der ersten und zweiten Elution befanden. In der SEC ergab sich sowohl für alle drei Antikörper eine Kurve und die SDS-PAGE mit den entsprechenden kurvenbildenden Fraktionen bestätigte den Proteinanteil. Diese Fraktionen wurden zusammengefasst und konzentriert. Hieraus ergab sich für CAT_i1 eine Ausbeute von 1,38 mg/L und für CAT_i2 von 2,31 mg/L.

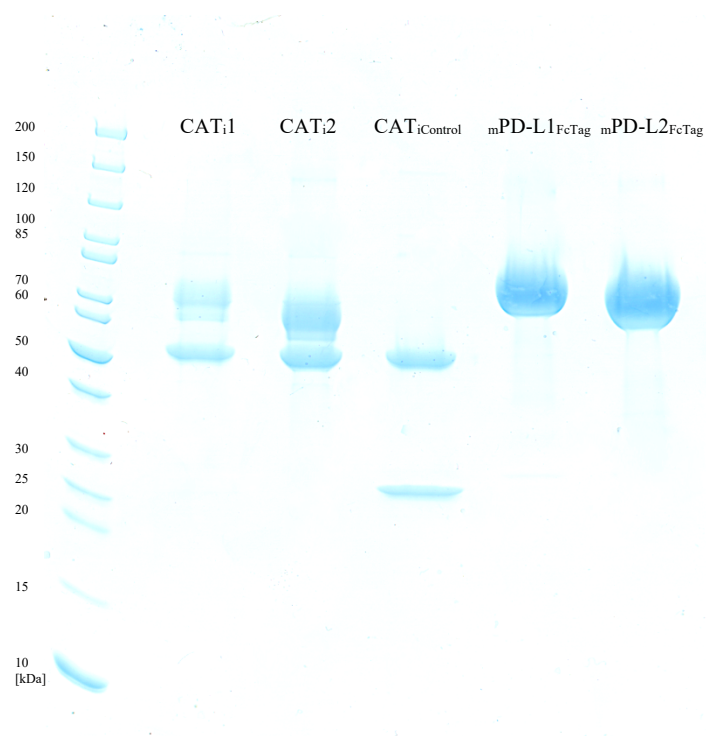


Abbildung 7: SDS-Gel der aufgereinigten Antikörper und Single-Chain-Formate.

SDS-Gel-Analyse der Antikörper CAT_i1, CAT_i2, CAT_iControl und der Single-Chain-Formate $mPD-L1-FC$ -Tag, $mPD-L2-FC$ -Tag zur Spezifitätskontrolle nach Aufreinigung mit Protein A und SEC.

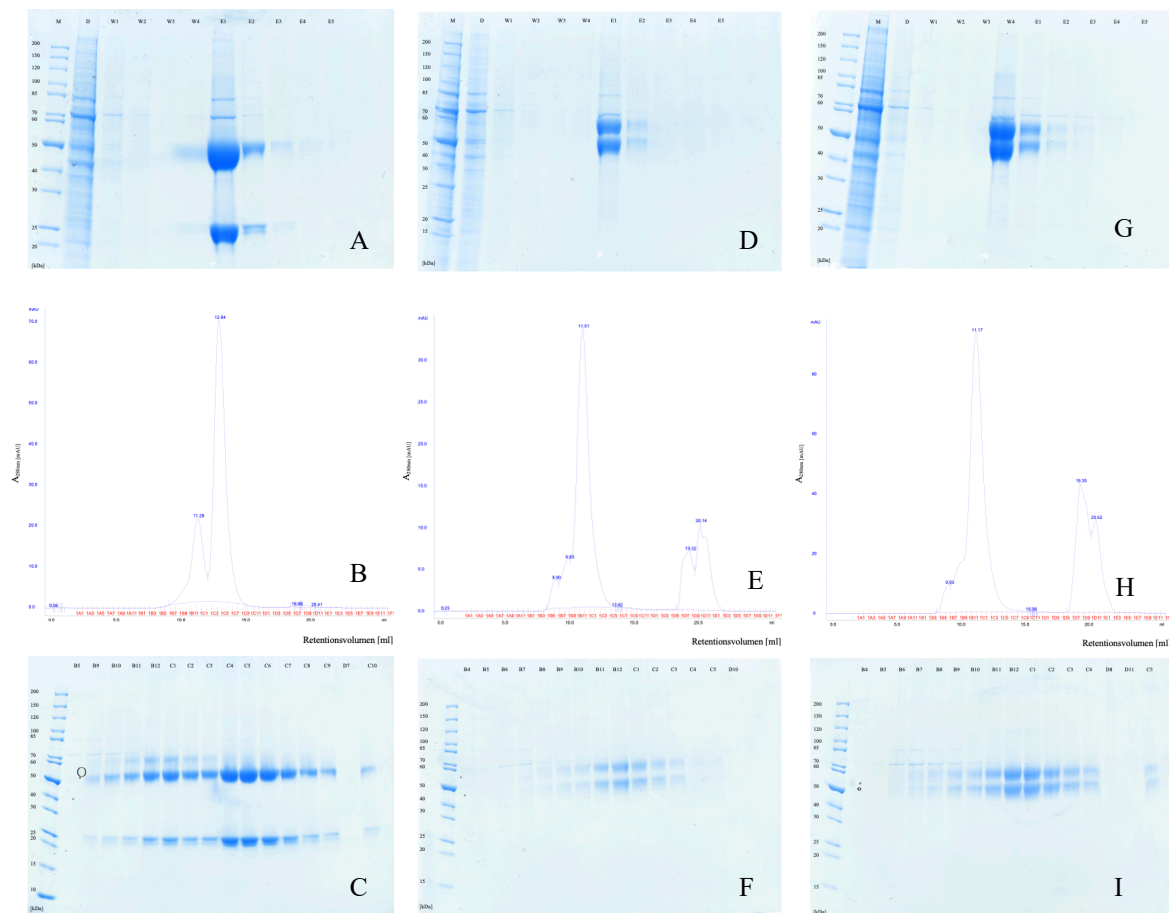


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Proteinaufreinigung mit Protein A der Antikörper CATiControl, CATi1, CATi2.

SDS-Gele der Aufreinigungsschritte für CATiControl (A-C), CATi1 (D-F) und CATi2 (G-I)

A/D/G) SDS-PAGE der Protein A Affinität aus Überstand der Expression in Expi293TM Zellen

B/E/H) SEC-Chromatogramm der Superdex 200 10/300 GL Säule.

C/F/I) SDS-PAGE zur Evaluierung der SEC-Fractionen am Kurvenhöhepunkt.

M=Größenmarkierung; D: Durchlauf; W1-W4: Waschungen; E1-E5: Elutionen.

4.2.2 Evaluation der Proteinstabilität von CATi1 und CATi2

Die Antikörper CATi1 und CATi2 wurden nach der Reinigung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Für die weitere Verwendung in in-vitro Assays und letztendlich für Mausstudien war eine Evaluation der Proteinstabilität sowohl nach dem Auftauen als auch bei längerer Lagerung in 37°C notwendig. Vor der Verwendung der Antikörper wurde die Konzentration mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 erneut gemessen. Hier ergaben sich zu keiner Zeit ein Abfall der Konzentration im Vergleich zu vor dem Einfrieren. Die Lagerung über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen bei 37°C schien ebenfalls keinen Einfluss auf die Stabilität zu haben. Wie den SDS-Gelen (Abbildung 9) zu entnehmen ist, ist

keinerlei Veränderung der Banden zu beobachten, was darauf hindeutet, dass keine Veränderung der Proteine bei längerfristiger „Lagerung“ bei 37°C entsteht.

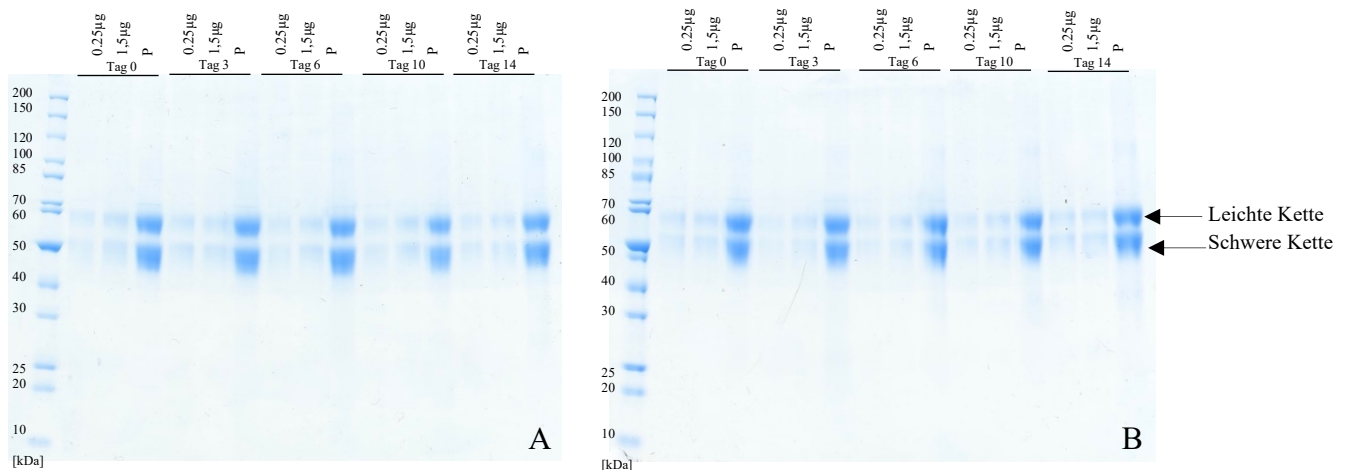


Abbildung 9: Analyse der Proteinstabilität.

SDS-PAGE von CAT₁ (A) und CAT₂ (B) nach Inkubation bei 37°C für 14 Tage. Analyse an angegebenen Tagen. P = Pellet.

4.3 Evaluation der Zielzelllinien

4.3.1 PD-1 Expression

Die Bindung von CAT₁ und CAT₂ an PD-1 ist zwar niedrigaffin, trotzdem wurden Zelllinien gewählt, die den Rezeptor exprimieren. Generell wird PD-1 auf T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Natürlichen Killerzellen und Dendritischen Zellen exprimiert. (17). Entsprechen kamen zwei T-Zell-Linien in Frage, die beide Abkömmlinge des C57Bl/6 Mausstammes sind und damit gleichzeitig die MHC H2-κB und IAb auf ihrer Oberfläche exprimieren.

In der Durchflusszytometrie sollte die Expression des PD-1 Rezeptors durch Verwendung eines Anti-PD-1-FITC Antikörpers abgeschätzt werden. Die Auswertung ergab keinen relevanten Unterschied der MFI (Mean Fluorescence Intensity) Quotienten, was für eine ähnliche Bindungsaffinität des FACS-Antikörpers und damit indirekt für eine wahrscheinlich ähnliche Expressionsdichte des PD-1 Rezeptors auf beiden Zelllinien spricht.

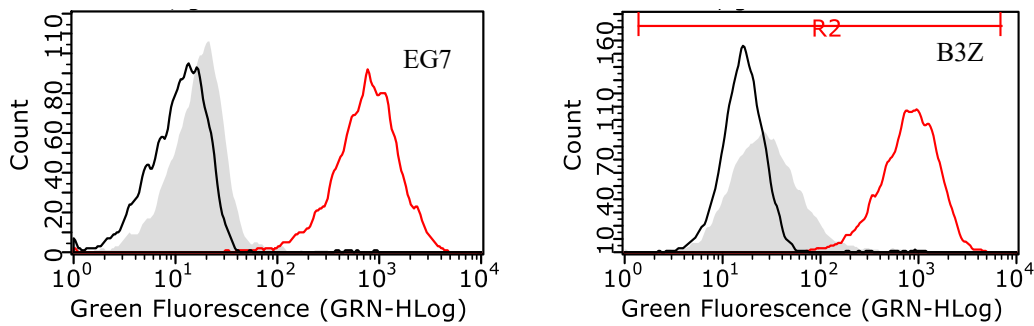


Abbildung 10: Detektion der PD-1 Expression auf EG7 und B3Z. Durchflusszytometrie. Evaluation der PD-1 Expression auf zwei T-Zell-Linien. Die schwarze Linie entspricht der Isotypenkontrolle.

MFI-Quotienten: EG7: MFI-Ratio = 31,3; B3: MFI-Ratio = 44,4.

4.3.2 MHC-I Expression

Wie erwähnt wurden der Einfachheit halber primär Antikörper mit variablen Domänen zur Bindung an den MHC-I H2-κB entwickelt. Eine Bindung an die Zielzelllinie EG7 wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

CAT_{iControl} zeigte für beide Zelllinien eine Verschiebung der Kurve nach rechts, was der Bindung des Antikörpers an die T-Zellen entspricht. Die MFI-Quotienten zeigten erneut keinen relevanten Unterschied zwischen den beiden Zelllinien.

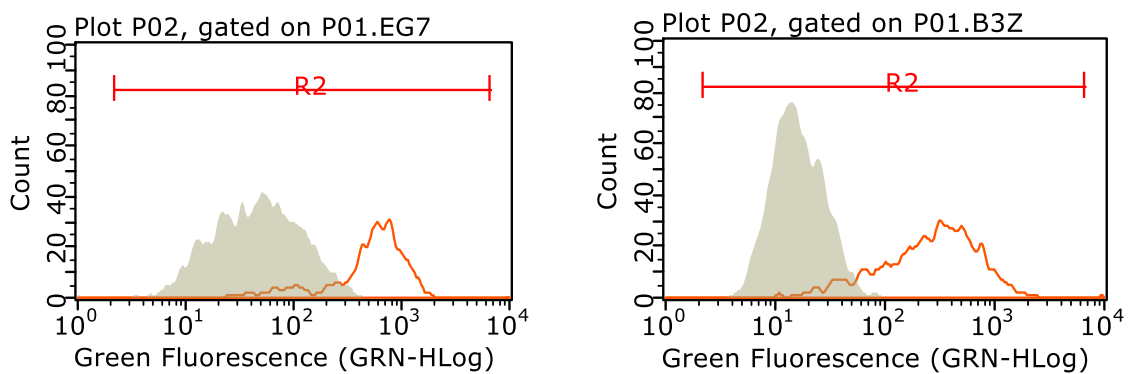


Abbildung 11: Bindung von CATiControl auf Zielzelllinien EG7 und B3Z.

Durchflusszytometrie. Evaluation der Bindung des Antikörpers CAT_{iControl} an T-Zelllinien. EG7 wurden mit α-hlgG Fc FITC-Antikörper gefärbt. Die grau hinterlegte Kurve entspricht der Kontrolle ohne Primärantikörper.

MFI-Quotienten: EG7 9,7
B3Z 7,6

4.4 Bindungsanalyse

4.4.1 Bindung an MHCI und MHCII

Bereits vor der externen Sequenzierung der variablen Sequenzen von Antikörpern der Hybridomzelllinien HB158 und HB163, wurde deren Bindung auf Splenozyten von Black-6-Mäusen untersucht. Beide Versuche zeigten eine Kurvenverschiebung nach rechts und zeigen dadurch eine Bindung der Antikörper an entsprechende Rezeptoren der Splenozyten.

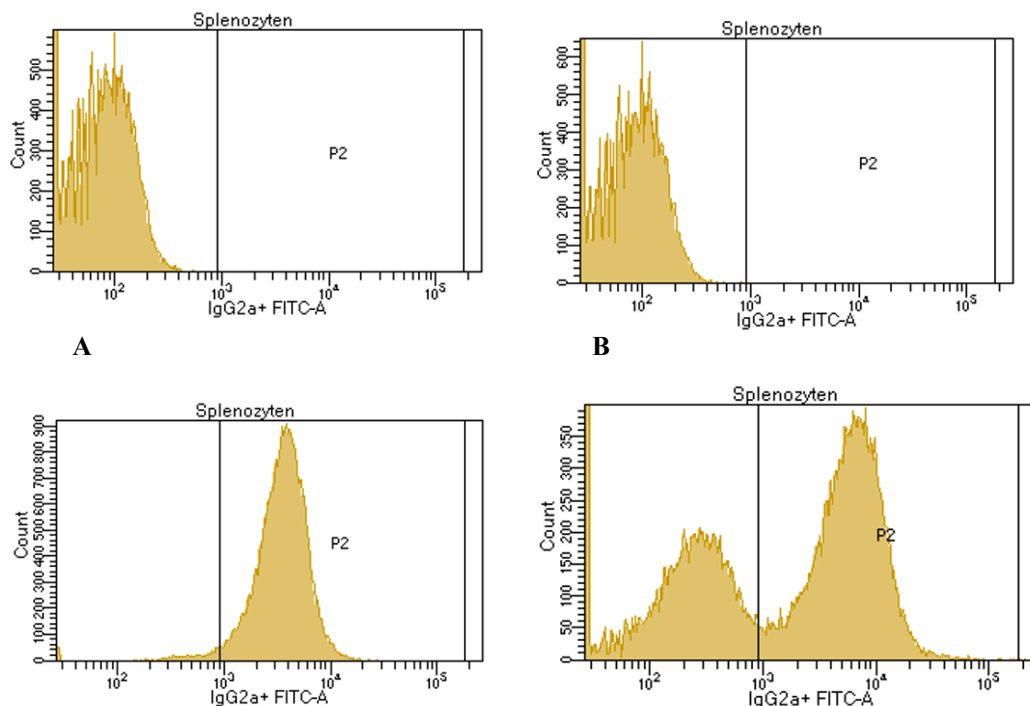


Abbildung 12: Bindung der Hybridomantikörper exprimiert von den Hybridomzelllinien HB158 bzw. HB163.

Durchflusszytometrie. Sekundärantikörper FITC mouse anti IgG-Fc (Thermo Fisher Scientific).

- A) Antikörper aus HB158 auf Splenozyten von C57Bl/6-Mäusen.
- B) Antikörper aus HB163 auf Splenozyten von C57Bl/6-Mäusen.

4.4.2 Bindung PD-1

Die exprimierten und aufgereinigten Fusionsproteine aus $mPD-L1_{ex}$ bzw. $mPD-L2_{ex}$ mit einem humanen Fc-Tag, entweder mit einer Ig-like-V-type und einer Ig-like-C2-type Domäne oder nur der Ig-like-V-Type Domäne, wurden zur Untersuchung des Bindungsverhaltens an den PD-1 Rezeptor genutzt. Durchflusszytometrisch wurde die Bindung der Fusionsproteine auf EG7 analysiert. Es ergab sich wie zu erwarten kein Unterschied zwischen einer Bindung der vollen extrazellulären Domänen zu den kürzeren IgV-folds mit FC-Tag. Die Bindung der $mPD-L2_{ex}$ -

Fusionsproteine mit mPD-1 schien im Vergleich etwas schwächer als die zwischen mPD-L1_{ex} und mPD-1 (siehe Abbildung 13).

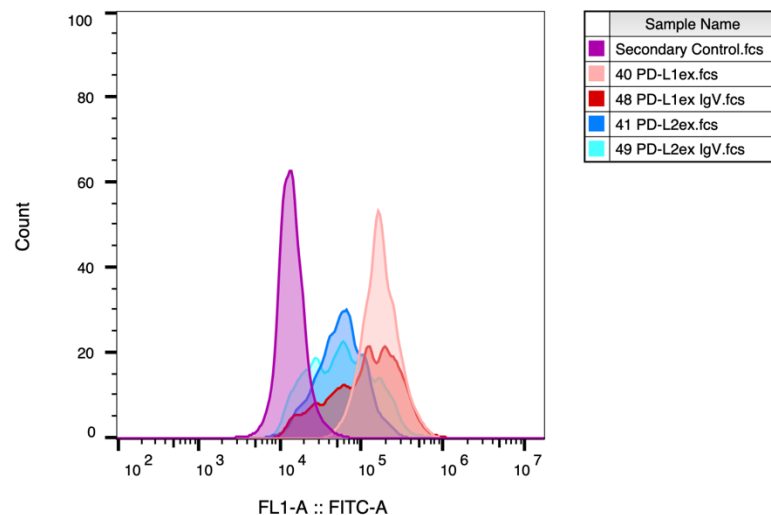


Abbildung 13: Bindung der mPD-L1ex und mPD-L2ex Fusionsproteine auf EG7.

Durchflusszytometrie. Analyse des Bindungsverhaltens der extrazellulären Domäne von murinem PD-L1 und PD-L1 in voller oder gekürzter Länge. Die pinke Kurve entspricht der Kontrolle mit Färbung durch Sekundärantikörper.

MFI-Quotienten:

<i>mPD-L1_{ex}-Fc</i>	= 12,8
<i>mPD-L1_{ex}IgV-Fc</i>	= 10,6
<i>mPD-L2_{ex}-Fc</i>	= 4,5
<i>mPD-L2_{ex}IgV-Fc</i>	= 5,7

4.4.3 Bindung von CAT_i1 und CAT_i2

Die Bindung des Kontrollantikörpers CAT_{iControl} an geeignete Zielzellen wurde bereits in Abbildung 12 dargestellt. Ob die Fusion von mPD-L1ex/mPD-L2ex an den N-Terminus, verbunden über einen (G4S)₄-Linker, einen Einfluss auf jene Bindung hat, sollte durch eine einfache Bindungsanalyse im selben Versuchsaufbau getestet werden. Entsprechend wurden EG7-Zellen auf die gewünschte Dichte von 2x10⁵ Zellen/well verdünnt und mit den Antikörpern CAT_i1 und CAT_i2 inkubiert. Die Auswertung zeigte für beide Antikörper eine Verschiebung der Kurve nach rechts im Vergleich zur Isotypenkontrolle und zeigt damit die Bindung an die Zellen an. Ob dabei primär eine Bindung zwischen H2-κB und variabler Domäne der Antikörper oder aber zwischen mPD-1 und den Liganden besteht, ist in diesem Versuchsaufbau nicht zu differenzieren. Zum Vergleich wurde die Bindung von CAT_{iControl}

untersucht, auch hier ließ sich eine Kurvenverschiebung nach rechts darstellen. Die MFI-Quotienten können zwar keine definitive Bindungsstärke beschreiben, aber die ähnlichen Werte für Antikörper- und Kontroll-Konstrukt könnten auf eine primäre Bindung über MHC schließen lassen.

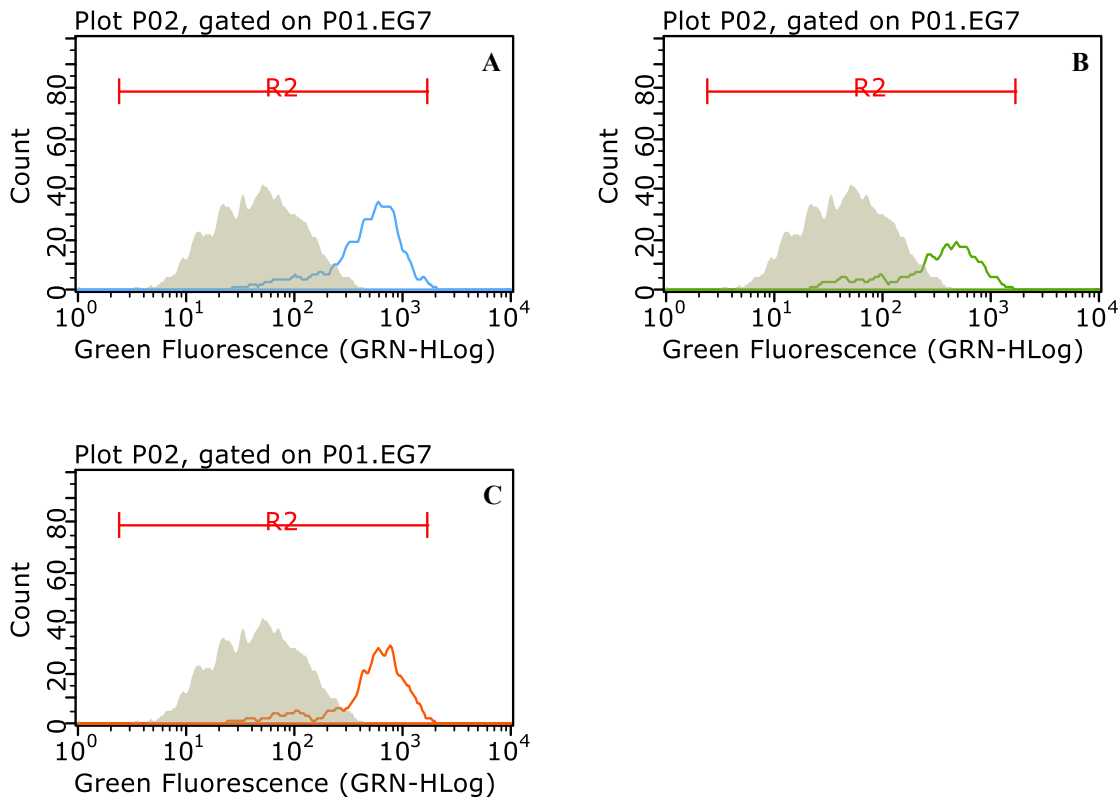


Abbildung 14: Bindung der Antikörper CATi1 und CATi2 an murine T-Zellen der Linie EG7.
Durchflusszytometrie.

- A) Bindung von CATi1 an EG7. MFI-Quotient = 9,11.
- B) Bindung von CATi2 an EG7. MFI-Quotient = 6,19.
- C) Bindung von CATiControl an EG7. MFI-Quotient = 9,7.

4.4.4 KD-FACS

Die Affinität zwischen zwei Bindungspartnern kann über die Dissoziationskonstante (K_D), was dem reziproken Maß der Assoziationskonstante entspricht, bestimmt werden.(23)

Hierfür wurde in unserem Versuchsaufbau CATiControl für die Betrachtung der Bindung an H2- κ B verwendet. Für die Bindung zwischen mPD-1 und den Liganden mPD-L1_{ex} und mPD-L2_{ex} wurden die Fusionsproteine aus extrazellulären Domänen der Liganden und humanem Fc-Tag

verwendet. In diesem Versuchsaufbau wurden lediglich die vollen extrazellulären Domänen, bestehend aus Ig-like-V-fold und Ig-like-C2-type Domäne, der Liganden verwendet. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt und die Ergebnisse in nachstehender Abbildung zusammengefasst (Abbildung 15).

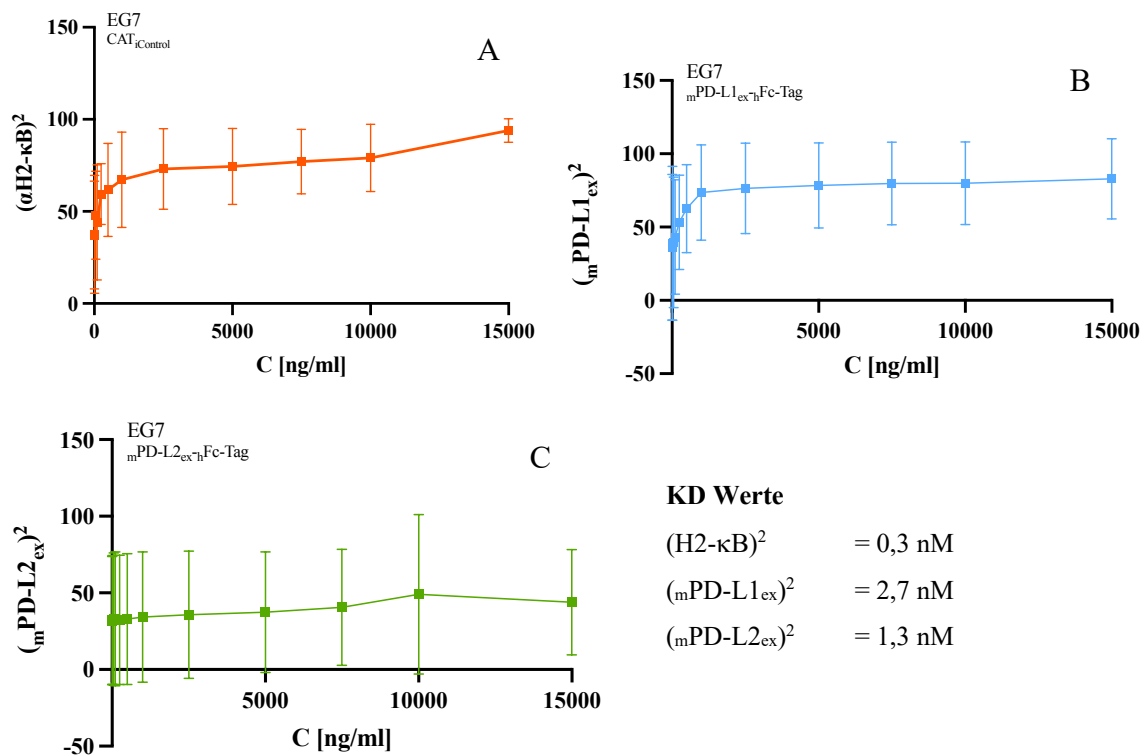


Abbildung 15: KD-Wert Bestimmung für H2-κB, mPD-L1ex und mPD-L2ex.

Konzentrationsabhängige Bindung von $\text{CAT}_{\text{iControl}}$ an H2-κB (A), $\text{mPD-L1}_{\text{ex}}$ an mPD-L1 (B) und $\text{mPD-L2}_{\text{ex}}$ an mPD-L1 (C). Der Graph zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Die K_D -Werte sind neben den Graphen angegeben.

Die in der Abbildung 15 in Nanomolar angegebenen Werte für die Dissoziationskonstanten wurden mit Hilfe des theoretisch bestimmten molekularen Gewichts der Fusionsproteine bzw. des Antikörpers bestimmt und stimmen gegebenenfalls nicht mit dem realen K_D -Wert überein.

4.5 Funktionelle Charakterisierung

4.5.1 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)

Die Bindung von CAT_i1 und CAT_i2 sollte durch die Bindung an den jeweiligen MHC diesen maskieren. Einer möglichen Immunantwort, ausgelöst durch den Fc-Anteil des Antikörperformates, sollte durch eine Silencing-Mutation entgegengewirkt werden. Diese Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), respektive das nicht Vorhandensein jener, wurde evaluiert. Hierfür wurden Zielzellen, in diesem Fall der Linie EG7 für die Antikörper CAT_i1, CAT_i2, CAT_iControl und der Linie MOLM für die indirekte Positivkontrolle mit einem gegen CD33 gerichtete Antikörper, mit Calcein markiert. Die markierten Zellen wurden anschließend mit den entsprechenden Antikörpern und humanen natürlichen Killerzellen, gewonnen aus PBMCs, inkubiert und die spezifische Lyse durch das Messen des freigesetzten Calcein im Überstand bestimmt. Die spezifische Lyse in Abhängigkeit der Konzentration der Antikörper ist in Abbildung 16 dargestellt.

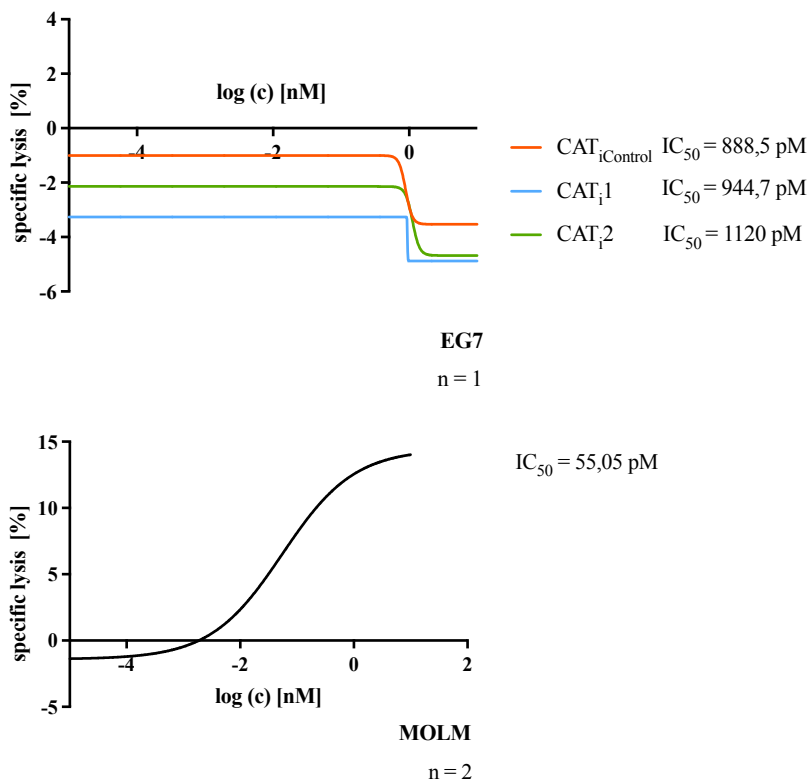


Abbildung 16: Analyse der Antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) der Antikörperformate CAT1, CAT2, und CATiControl.

- A) Als Zielzellen für die Antikörperformate wurden EG7, als Effektorzellen aus PBMC gewonnene NK-Zellen im Verhältnis E:T 2:1 verwendet.
- B) Für die indirekte Positivkontrolle wurden stattdessen MOLM-Zellen als Zielzellen verwendet.

Während durch die Bindung des gegen CD33 gerichteten Antikörpers an MOLM-Zellen klar eine Lyse der Zellen ausgelöst wird, war dies im Vergleich bei CAT_i1, CAT_i2, CAT_{iControl} nicht zu beobachten.

Theoretisch wäre eine Zytotoxizität durch eine Bindung von PD-1 an einen seiner Liganden denkbar und in diesem Modell auch erwünscht, dies konnten im Versuch allerdings nicht nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Die aktuelle immunsuppressive Therapie für Patient:innen nach einer erfolgreichen allogenen Organtransplantation setzt sich größtenteils aus einer Kombination von Wirkstoffen zusammen, welche die Gesamtheit der T-Zellen inhibieren, ergänzt durch Kortison. Diese induzierte Immunschwäche bedingt zahlreiche Nebenwirkungen, darunter eine erhöhte Anfälligkeit für opportunistische Infektionen und ein gesteigertes Tumorrisiko, was gravierende gesundheitliche Risiken mit sich bringt. Das Hauptziel dieser Arbeit war die erstmalige Entwicklung eines Antikörpers, der spezifisch an MHC-Moleküle des Spenderorgans bindet und eine immunsupprimierende Wirkung durch niedrigaffine Bindung von PD-L1/PD-L2 an PD-1 der empfangereigenen T-Zellen zeigt. Mit Medikamenten mit diesen Eigenschaften könnte die Immunsuppression im Spenderorgan konzentriert werden und systemische Nebenwirkungen wären theoretisch vermeidbar.

Im Rahmen dieser Studie wurden zwei chimäre Antikörper mit murinen Bindungsstellen und einem humanen Rückgrat exprimiert. Die N-terminal angehängten Liganden PD-L1 oder PD-L2 sind murin. Die beiden Prototypen CATi1 und CATi2 zeigten in vitro eine spezifische hochaffine Bindung an H2-κB. Eine Aktivierung von Natürlichen Killerzellen war trotz Silencing-Mutation des FC-Teils der Antikörper nicht zu beobachten.

5.1 Antikörperformat – die richtige Wahl?

Bei der Entwicklung neuer immunmodulatorischer Therapien stellt sich die Frage nach dem passenden Antikörperformat. Antikörper sind heute weitgehend etabliert (34), vor allem in der Onkologie, mit Belatacept nun auch in der Transplantationsmedizin (35).

Antikörper bestehen aus je zwei identischen schweren und leichten Ketten (5). Daraus ergibt sich ein größeres Molekül im Vergleich zu einem Minibody, der nur aus den variablen Segmenten der schweren und leichten Kette mit einem Fc-Anteil eines Antikörpers besteht, oder einem Single-Chain-Format. Das geringere Molekulargewicht verhält sich proportional zur Halbwertszeit (34) (siehe Abbildung 15). Theoretisch müsste ein Antikörper entsprechend therapeutisch seltener appliziert werden als bspw. ein Minibody, da er eine höhere Halbwertszeit besitzt (36), und damit den klaren Vorteil einer höheren Lebensqualität für Patient:innen bieten könnte.

Ziel ist, ein Antikörperformat zu entwickeln, das sowohl stabil als auch beweglich ist und sich mit hoher Ausbeute exprimieren lässt. CAT_i1 und CAT_i2 zeigten eine Temperaturstabilität über 14 Tage bei 37°C (siehe Kapitel 4.2.2). Die nachgewiesene Bindungsaffinität und Interaktion mit mPD-1 spricht für eine ausreichende Flexibilität durch die (G4S)₄-Linker. Allerdings ist die Ausbeute mit 1,38 mg/L für CAT_i1 und für CAT_i2 von 2,31 mg/L unzureichend (Monika Herrmann, persönliche Kommunikation, 2018). Um generell eine Expression zu erreichen, wurde in der Entwicklung von CAT_i1 und CAT_i2 bereits die leader sequenz an die der aus den Hybridomzellen abstammenden Antikörpern angepasst und von einem ursprünglich murinen Antikörperbackbone auf ein humanes gewechselt. Um die Ausbeute der Expression zu verbessern, sind zahlreiche weitere Veränderungen in der Konzeption des Antikörpers denkbar, z.B. das Anhängen von PD-L1/2 an den C-Terminus statt den N-Terminus oder Verwenden einer längeren oder kürzeren Variante des verwendeten (G4S)₄-Linkers. Ob und welchen Einfluss diese Veränderungen auf die Ausbeute letztlich haben ist prospektiv nicht zu beurteilen, da die Tertiärstruktur nicht bekannt ist, die Expression aber maßgeblich davon abhängt (36). Auch ein anderes Expressionssystem als das von unserer Arbeitsgruppe verwendete Expi293-System ist denkbar, bspw. eine Expression im ExpiCHO-System könnte höhere Proteinkonzentration erbringen (37).

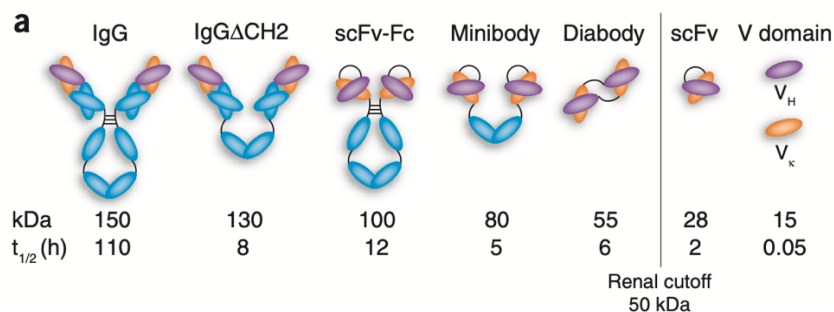


Abbildung 17: Darstellung verschiedener Antikörper, Minibody und Single-Chain-Formate und weiteren und Angabe ihrer jeweiligen Halbwertszeit in vivo.

Proportionaler Zusammenhang des Molekularen Gewichts (Angabe in kDa) zur Halbwertszeit in vivo.

Positiv für die jetzigen Antikörperformate CAT_i1 und CAT_i2 und deren Struktur spricht ihre Temperaturstabilität sowohl bei 37°C als auch bei langer Lagerung in eingefrorenem Zustand. Zuletzt ist die chimäre Konzeption von CAT_i1 und CAT_i2 zu diskutieren. Die Humane-Anti-Maus-Antikörper (HAMA)-Reaktion ist ein bekanntes klinisches Phänomen, wobei humane

Antikörper gegen murine Immunglobuline gebildet werden, z.B. im Rahmen einer Therapie mit mABs. Dadurch kann es zur Beeinträchtigung von Immunassays kommen (38). Ein äquivalentes Phänomen bei der Gabe von humanen Antikörpern in Mäusen ist theoretisch denkbar, allerdings in der Literatur bis jetzt nicht beschrieben. Letztlich wäre dies für die Anwendung am Menschen irrelevant.

5.2 MHC - ein spezifisches Ziel

Die Major Histocompatibility Komplexe werden beim Menschen auch als Human Leucocyte Antigen (HLA) bezeichnet (39) und weisen durch genetischen Polymorphismus die größtmögliche Vielfalt auf. Das macht sie für jeden Menschen einzigartig und das Immunsystem besonders anpassungsfähig (5). Für die Transplantationsmedizin ist die Kenntnis über die jeweilige HLA-Expression wichtig, da eine möglichst hohe Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger maßgeblich die Transplantatabstoßungswahrscheinlichkeit verringert. Eine völlige Übereinstimmung der HLA ist nur bei eineiigen Zwillingen möglich, jedoch kann durch präoperative Typisierung und entsprechende Zuordnung der Spenderorgane eine hohe Übereinstimmung erreicht werden (9).

HLA als Ansatzpunkt für Antikörpertherapien zu wählen bietet vielfältige Möglichkeiten, ist aber auch in der praktischen Umsetzung anspruchsvoll. Es kann nicht, wie im Mausmodell, nur ein einziger therapeutischer Antikörper entwickelt werden, sondern es müssten stattdessen mehrere Varianten exprimiert werden, die mit ihrer Bindungsstelle dann eine größtmögliche Schnittmenge der Population abdecken. Hier ist eine Auswertung der weltweiten Datenbanken, wie bspw. der IMGT/HLA-Database oder der AFND, zur HLA-Expression denkbar, um dann eine Auswahl an Ziel-Sequenzen zu bestimmen (40). Es ist trotzdem zu erwarten, dass einige Patient:innen nicht „passende“ HLA-Merkmalsträger:innen sind und die Therapie somit nicht angewendet werden kann.

5.3 Die immunsuppressive Komponente

Über die Co-Inhibitorische Wirkung auf T-Zellen durch Bindung des PD-1 Rezeptors an einen seiner Liganden wird inzwischen mehr bekannt und er gilt gerade in der Tumorthherapie als relevanter Therapieansatzpunkt (22, 41). Jene Bindung zwischen Rezeptor und den Liganden ist natürlicherweise niedrigaffin (13, 16, 17), dadurch sollten nur T-Zellen in unmittelbarer Nähe des Spenderorgans inhibiert werden, theoretisch ist aber eine Inhibition von frei

zirkulierenden T-Zellen und somit eine allgemeine immunsuppressive Wirkung denkbar. Ob und wie ausgeprägt diese eintritt und welche Folgeerscheinungen sich für Patient:innen dadurch ergeben kann erst durch in vivo Studien evaluiert werden.

Die beiden Liganden des PD-1 Rezeptors haben eine ähnliche Tertiärstruktur und binden mit der extrazellulären IgV-Domäne an PD-1. Trotz dieser Ähnlichkeiten scheint es minimale Unterschiede in der Bindungsstärke der beiden zu geben und die Bindung zwischen PD-1 und PD-L2 etwas stärker zu sein (13, 16, 17, 41). Bei beiden Bindungen kommt es zur Aufhebung der, durch die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC ausgelösten, T-Zell-Aktivierung (42). Diese Wirkung sollte also theoretisch nur bei bereits begonnener T-Zell-Aktivierung eintreten, nicht bei ruhenden T-Zellen, z.B. also bei T-Zellen die spenderspezifisches HLA erkennen und gebunden haben. Ob dieses immunsuppressive Signal ausreichend wäre, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern ist unklar. Gegebenenfalls könnte eine Unterstützung durch entweder weitere inhibitorische Signale, wie z.B. TGF-beta, notwendig sein, um den Effekt der Therapie zu optimieren. Natürlich ist eine gleichzeitige Anwendung von „klassischen“ Immunsuppressiva, wie Corticosteroide oder Calcineurininhibitoren, möglich. Positiv an dieser Kombination wäre, dass es sich um verschiedene Signalwege handelt und es nicht zu einer Konkurrenz der Therapien kommen sollte.

5.4 Optimierung des ADCC-Assays

Die Überprüfung des ADCC diene der Kontrolle, dass keine Immunzellen durch die FC-Region des Antikörpers angelockt werden. Der Versuchsaufbau erfordert eine Positivkontrolle, um zu gewährleisten, dass die verwendeten humanen Natürlichen Killerzellen aktiv sind und ein „Killing“ auch möglich wäre (43). Dies konnte nur indirekt bestätigt werden, da kein Antikörper mit gleicher Bindungsstelle wie CAT_i1 und CAT_i2 und aktiver FC-Region, also ohne entsprechende Silencing Mutation, exprimiert wurde. Behelfsmäßig wurde ein anderer Antikörper mit anderer Bindungsstelle und aktiver FC-Region als indirekte Kontrolle mit in den Versuch aufgenommen. Zudem wurde der Versuch lediglich ein bzw. zwei Mal durchgeführt, was keine statistisch verwertbare Daten ergibt. Eine echte Evaluierung der Zytotoxizität der Prototypen CAT_i1 und CAT_i2 steht noch aus.

5.5 Risiken und Nebenwirkungen

Die Suche nach neuen immunsuppressiven Therapien ergibt sich aus den starken unerwünschten Wirkungen der verfügbaren Präparate. Die wichtigsten sind die deutlich erhöhte Anfälligkeit für die Infektion mit opportunistischen Erregern und das erhöhte Tumorrisiko, daneben häufen sich zahlreiche andere Nebenwirkungen je nach Wirkstoff (44). Der Anspruch an CAT₁ bzw. daraus weiter entwickelte Antikörper oder antikörperähnliche Formate ist, dass die Summe und Schwere der Nebenwirkungen geringer sind. Aus der Theorie ergibt sich dieser Effekt auch, jedoch ist unklar, welche neuen unerwünschten Wirkungen auftreten könnten. Es gibt keinen zugelassenen Antikörper, der auf die Weise wie das hier entwickelte Modell wirkt, deshalb kann nicht auf die zu erwartenden Nebenwirkungen geschlossen werden.

5.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit trägt zur Entwicklung einer vielversprechenden immunmodulatorischen Therapie nach allogener Organtransplantation bei. Die Konzeption chimärer Antikörper, die gezielt an MHC-Moleküle des Spenderorgans binden und durch die niedrigaffine Bindung von PD-L1/PD-L2 an PD-1 der empfängereigenen T-Zellen eine immunsuppressive Wirkung auslösen, eröffnet potenziell effektive Wege für eine präzisere, nebenwirkungsärmere Immunsuppression.

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung erster Prototypen für eine spezifische lokal wirksame Immunsuppression durch Antikörper beschrieben. Die Ausarbeitung und in-vivo Untersuchung der Wirksamkeit jener Prototypen steht bis dato noch aus, ist aber maßgeblich relevant für die weitere oder simultan ablaufende Weiterentwicklung. Einige Gedanken können allerdings schon formuliert werden.

So ist die immunmodulatorische Komponente der Antikörper CAT₁ und CAT₂ beziehungsweise möglicher Nachfolger leicht austauschbar und zu erweitern. Möglich wäre eine T-Zellinhibition durch Angriff mehrerer Signalwege oder aber die Ergänzung des primären inhibitorischen Signals, einem der Liganden des PD-1 Rezeptors, durch ein unterstützendes Signal. Je nach Stand der Forschung und neuen Erkenntnissen zum Immuncheckpoint kann der Antikörper angepasst werden. Die jeweilige Effektivität muss jeweils neu bestimmt werden.

Ein klarer Vorteil ergibt sich aus der Bindung an MHC bzw. HLA, denn die Fab-Domäne kann an den Spender angepasst werden, egal ob dieser human oder einer anderen Spezies angehört ist. Die Xenotransplantation hat in den letzten Jahren große Fortschritte erzielen können (45)

und bietet eine vielversprechende Lösung für den allgemein bestehenden „Organmangel“ in Europa (46). Eine gleichzeitige Entwicklung von passenden Immunsuppressiva ist notwendig. Die Anwendbarkeit von CAT_i ist nicht einzig auf transplantierte Patient: innen zu beschränken. Einige Autoimmunerkrankungen, wie bspw. Morbus Bechterew, stehen in direktem Zusammenhang mit dem HLA-Typ (9) und ein Einsatz bei diesen Erkrankungen ist denkbar.

Insgesamt markiert diese Arbeit einen Fortschritt in Richtung einer gezielteren und schonenderen immunmodulatorischen Behandlung nach Organtransplantationen. Die Ergebnisse und Erkenntnisse legen nahe, dass eine präzise Immunmodulation durch Antikörper eine vielversprechende Therapieoption darstellt, um die Lebensqualität der Patient: innen zu verbessern und die Erfolgsaussichten von Transplantationen zu optimieren. Zukünftige Forschung und klinische Studien sollten diese Ansätze weiter vertiefen, um möglicherweise eine neue Ära der Immuntherapie für Transplantationspatient: innen zu begründen.

6 Quellenverzeichnis

1. Hatzinger M, Stastny M, Grützmacher P, Sohn M. Die Geschichte der Nierentransplantation. *Der Urologe*. 2016;55(10):1353-9.
2. Nagel E, Schmidt P. Zur Geschichte und Entwicklung der Organtransplantation. In: Pichlmayr R, editor. *Transplantation: Leben durch fremde Organe*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996. p. 1-16.
3. Johannesson L, Kvarnström N, Mölne J, Dahm-Kähler P, Enskog A, Diaz-Garcia C, et al. Uterus transplantation trial: 1-year outcome. *Fertil Steril*. 2015;103(1):199-204.
4. Eurotransplant. 2021.
5. Murphy KM, Weaver C, Janeway C. *Janeway Immunologie*. Berlin, Germany: Springer Spektrum; 2018. XL, 1205 Seiten p.
6. Charron D. HLA, immunogenetics, pharmacogenetics and personalized medicine. *Vox Sang*. 2011;100(1):163-6.
7. Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K, Kochan G, et al. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*. 2017;8(31):51936-45.
8. Welsch U, Kummer W, Deller T. *Histologie*. München: Elsevier; 2018. 1 Online-Ressource p.
9. G H. *Innere Medizin* 2020.
10. Tolsma V, Schwebel C, Azoulay E, Darmon M, Souweine B, Vesin A, et al. Sepsis severe or septic shock: outcome according to immune status and immunodeficiency profile. *Chest*. 2014;146(5):1205-13.
11. Aguiar D, Martínez-Urbistondo D, D'Avola D, Iñarrairaegui M, Pardo F, Rotellar F, et al. Conversion from Calcineurin Inhibitor-Based Immunosuppression to Mycophenolate Mofetil in Monotherapy Reduces Risk of De Novo Malignancies After Liver Transplantation. *Ann Transplant*. 2017;22:141-7.
12. Chowdhury TA. Post-transplant diabetes mellitus. *Clin Med (Lond)*. 2019;19(5):392-5.
13. Cheng X, Veverka V, Radhakrishnan A, Waters LC, Muskett FW, Morgan SH, et al. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *J Biol Chem*. 2013;288(17):11771-85.
14. Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer*. 2021;12(9):2735-46.
15. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*. 2004;173(2):945-54.
16. Lin DY, Tanaka Y, Iwasaki M, Gittis AG, Su HP, Mikami B, et al. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):3011-6.
17. Zak KM, Grudnik P, Magiera K, Domling A, Dubin G, Holak TA. Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure*. 2017;25(8):1163-74.
18. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
19. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12(6):492-9.

20. Kim HD, Song GW, Park S, Jung MK, Kim MH, Kang HJ, et al. Association Between Expression Level of PD1 by Tumor-Infiltrating CD8(+) T Cells and Features of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2018;155(6):1936-50.e17.
21. AiErken N, Shi HJ, Zhou Y, Shao N, Zhang J, Shi Y, et al. High PD-L1 Expression Is Closely Associated With Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Leads to Good Clinical Outcomes in Chinese Triple Negative Breast Cancer Patients. *Int J Biol Sci*. 2017;13(9):1172-9.
22. Twomey JD, Zhang B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *Aaps j*. 2021;23(2):39.
23. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJJ, Stryer L. *Stryer Biochemie*. Berlin: Springer Spektrum; 2018.
24. Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. *Nature*. 1991;349(6307):293-9.
25. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.
26. Mullard A. New checkpoint inhibitors ride the immunotherapy tsunami. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(7):489-92.
27. Kwok G, Yau TC, Chiu JW, Tse E, Kwong YL. Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(11):2777-89.
28. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csöszi T, Fülöp A, et al. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *J Clin Oncol*. 2019;37(7):537-46.
29. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-34.
30. Green MR SJ, Sambrook J. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. XXXIII, 630, 46 Seiten p.
31. Arduin E, Arora S, Bamert PR, Kuiper T, Popp S, Geisse S, et al. Highly reduced binding to high and low affinity mouse Fc gamma receptors by L234A/L235A and N297A Fc mutations engineered into mouse IgG2a. *Mol Immunol*. 2015;63(2):456-63.
32. Tse GH, Hughes J, Marson LP. Systematic review of mouse kidney transplantation. *Transpl Int*. 2013;26(12):1149-60.
33. Li CW, Lim SO, Chung EM, Kim YS, Park AH, Yao J, et al. Eradication of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Targeting Glycosylated PD-L1. *Cancer Cell*. 2018;33(2):187-201.e10.
34. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*. 2005;23(9):1126-36.
35. Noble J, Jouve T, Janbon B, Rostaing L, Malvezzi P. Belatacept in kidney transplantation and its limitations. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(4):359-67.
36. Tiller KE, Tessier PM. Advances in Antibody Design. *Annu Rev Biomed Eng*. 2015;17:191-216.
37. Jain NK, Barkowski-Clark S, Altman R, Johnson K, Sun F, Zmuda J, et al. A high density CHO-S transient transfection system: Comparison of ExpiCHO and Expi293. *Protein Expr Purif*. 2017;134:38-46.
38. Klee GG. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(6):921-3.
39. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(10):702-9.

40. Gonzalez-Galarza FF, McCabe A, Melo Dos Santos EJ, Jones AR, Middleton D. A snapshot of human leukocyte antigen (HLA) diversity using data from the Allele Frequency Net Database. *Hum Immunol.* 2021;82(7):496-504.
41. Ai L, Xu A, Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1248:33-59.
42. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704.
43. Herrmann M, Krupka C, Deiser K, Brauchle B, Marcinek A, Ogrinc Wagner A, et al. Bifunctional PD-1 \times α CD3 \times α CD33 fusion protein reverses adaptive immune escape in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2018;132(23):2484-94.
44. Karow T. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2021.
45. DiLillo DJ, Ravetch JV. Fc-Receptor Interactions Regulate Both Cytotoxic and Immunomodulatory Therapeutic Antibody Effector Functions. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(7):704-13.
46. Annual Report Eurotransplant 2021 2022 [Available from: <https://www.eurotransplant.org/statistics/annual-report/>].

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Zelllinien	20
Tabelle 2: Vektoren, die zur Proteinexpression verwendet wurden.....	20
Tabelle 3: Im Rahmen dieser Arbeit generierte Expressionsvektoren.....	21
Tabelle 4: Zur Klonierung verwendete Primer	22
Tabelle 5: Zur Sequenzierung verwendete Primer	23
Tabelle 6: Aminosäuresequenzen von Bindungsköpfen und Liganden.....	24
Tabelle 7: Kommerzielle Antikörper, die für FACS Analyse und Western Blots verwendet wurden	25
Tabelle 8: Standardmäßig verwendete Puffer für biochemische Methoden und Zellkultur	25
Tabelle 9: Verwendetes Medium und Puffer für E.Coli	26
Tabelle 10: Verwendete Geräte	26
Tabelle 11: Verwendete Software	27
Tabelle 12: Verwendete DNA-Sequenzen der variablen Regionen für leichte und schwere Ketten.....	30
Tabelle 13: Antibiotika, Konzentration.....	31

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung mit Einblendung gängiger Immunsuppressiver Therapien an ihren Ansatzpunkten. APC = Antigen präsentierende Zelle. mTOR = mammalian target of rapamycin. IL2 = Interleukin 2. NFAT = Nuclear factor of activated T cells. T_c = Zytotoxische T-Zelle. T_H = T-Helferzelle.....	12
Abbildung 2: Kristallstruktur der Komplexe aus mPD-1 mit hPD-L1/mPD-L2. Komplex aus mPD-1/hPD-L1 (A) und mPD-1/mPD-L2 (B). Bei beiden Komplexen ist sichtbar, dass die Bindung von PD-1 an seinen Liganden nur über den V-like-Domäne erfolgt. (17)	14
Abbildung 3: Mikrophotographien von Schnitten eines Triple negativen Mammakarzinoms nach immunhistochemischer Färbung auf PD-L1. Korrelation zwischen PD-L1-Expression und Prävalenz von Tumor-infiltrierenden Lymphocyten (TIL). Die PD-L1 Expression und die Prävalenz von TIL sind mit einem längeren Gesamtüberleben und Krankheitsfreies Überleben assoziiert. Quelle: AiErken, Shi (21).....	15

Abbildung 4: Struktur eines Antikörpers. (23) Links: Darstellung eines Antikörpers in Tertiärstruktur (2D) bestehend aus zwei schweren Ketten (blau) und zwei leichten Ketten (rot), die zusammen die beiden variablen Domänen F_{ab} mit der Antigenbindungsstelle bilden sowie der F_c Domäne, die unter anderem an der Komplementaktivierung beteiligt ist. Rechts: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.....	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Antikörperformate. A: Antikörper der Klasse IgG. Der F_c -Anteil (dunkelgrau) wurde durch Punktmutationen gesilenced. Angehängt sind immunsuppressive Komponenten durch G4S4 Linker am N-Terminus der variablen Domäne des Antikörpers, im Beispiel links die extrazelluläre Domäne des murinen PD-L1 und rechts des murinen PD-L2. In orange dargestellt ist die F_v -Domäne, die der Bindungsstelle des Antikörpers entspricht. Hier soll im Mausmodell MHC Klasse I oder II von C57 Bl/6 Mäusen gebunden werden. B: Vereinfachte Darstellung der simultanen Bindung an das Transplantat und einer T-Zelle via PD-L1 oder PD-L2	40
Abbildung 6: Vektorkarten der schweren und der leichten Ketten.	41
Abbildung 7: SDS-Gel der aufgereinigten Antikörper und Single-Chain-Formate. SDS-Gel-Analyse der Antikörper CAT_{i1} , CAT_{i2} , $CAT_{iControl}$ und der Single-Chain-Formate $mPD-L1$ -FC-Tag, $mPD-L2$ -FC-Tag zur Spezifitätskontrolle nach Aufreinigung mit Protein A und SEC.....	42
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Proteinaufreinigung mit Protein A der Antikörper $CAT_{iControl}$, CAT_{i1}, CAT_{i2}. SDS-Gele der Aufreinigungsschritte für $CAT_{iControl}$ (A-C), CAT_{i1} (D-F) und CAT_{i2} (G-I).....	43
Abbildung 9: Analyse der Proteinstabilität. SDS-PAGE von CAT_{i1} (A) und CAT_{i2} (B) nach Inkubation bei 37°C für 14 Tage. Analyse an angegebenen Tagen. P = Pellet.	44
Abbildung 10: Detektion der PD-1 Expression auf EG7 und B3Z. Durchflusszytometrie. Evaluation der PD-1 Expression auf zwei T-Zell-Linien. Die schwarze Linie entspricht der Isotypenkontrolle.	45
Abbildung 11: Bindung von $CAT_{iControl}$ auf Zielzelllinien EG7 und B3Z. Durchflusszytometrie. Evaluation der Bindung des Antikörpers $CAT_{iControl}$ an T-Zelllinien. EG7 wurden mit α -hIgG F_c FITC-Antikörper gefärbt. Die grau hinterlegte Kurve entspricht der Kontrolle ohne Primärantikörper.....	45

Abbildung 12: Bindung der Hybridomantikörper exprimiert von den Hybridomzelllinien HB158 bzw. HB163. Durchflusszytometrie. Sekundärantikörper FITC mouse anti IgG-Fc (Thermo Fisher Scientific).....	46
Abbildung 13: Bindung der mPD-L1ex und mPD-L2ex Fusionsproteine auf EG7. Durchflusszytometrie. Analyse des Bindungsverhaltens der extrazellulären Domäne von murinem PD-L1 und PD-L1 in voller oder gekürzter Länge. Die pinke Kurve entspricht der Kontrolle mit Färbung durch Sekundärantikörper.....	47
Abbildung 14: Bindung der Antikörper CATi1 und CATi2 an murine T-Zellen der Linie EG7. Durchflusszytometrie.....	48
Abbildung 15: KD-Wert Bestimmung für H2-κB, mPD-L1ex und mPD-L2ex. Konzentrationsabhängige Bindung von CATiControl an H2-κB (A), mPD-L1ex an mPD-1 (B) und mPD-L2ex an mPD-1(C). Der Graph zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Die KD-Werte sind neben den Graphen angegeben.	49
Abbildung 16: Analyse der Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) der Antikörperformate CAT1, CAT2, und CATiControl.	50
Abbildung 17: Darstellung verschiedener Antikörper, Minibody und Single-Chain-Formate und weiteren und Angabe ihrer jeweiligen Halbwertszeit in vivo. Proportionaler Zusammenhang des Molekularen Gewichts (Angabe in kDa) zur Halbwertszeit in vivo.	53

9 Abkürzungsverzeichnis

bp	<i>base pairs</i>
F _c	<i>Fragment crystallizable</i>
F _v	<i>Fragment variable</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Human Leucocyte Antigen	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
IgA	<i>Immunglobulin A</i>
IgD	<i>Immunglobulin D</i>
IgE	<i>Immunglobulin E</i>
IgG	<i>Immunglobulin G</i>
IgM	<i>Immunglobulin M</i>
ITIM	<i>Immunorezeptor-Tyrosin-basierte Inhibitions motive</i>
ITSM	<i>Immunrezeptor-Tyrosin-basierte Schaltermotive</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity, Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NSCLC	<i>Non small cell lung cancer</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1	<i>Programmed Death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death Ligand 1</i>
PTDM	<i>Post Transplant Diabetes mellitus</i>
rmp	<i>rounds per minute</i>
SDS-PAGE	<i>Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese</i>
T _c	<i>Zytotoxische T-Zelle</i>
TCR	<i>T-Zell-Rezeptor</i>
T _H	<i>T-Helferzelle</i>
TNBC	<i>Triple Negative Breast Cancer</i>
VH	<i>Variable Heavy</i>
VL	<i>Variable Light</i>

Danksagung





Ich möchte mich an erster Stelle bei Herrn Professor Dr. Markus Guba und Dr. Julian Bucher für die Möglichkeit dieser Doktorarbeit und die gute Betreuung bedanken.

Ein ebenso großer Dank an Professor Dr. Karl-Peter Hopfner und Dr. Monika Herrmann, dass ich einen Großteil meiner Arbeit am Genzentrum München durchführen durfte und auch hier eine so gute Betreuung hatte.

Danke an das ganze Team der Chirurgischen Forschung Großhadern und alle happy Hopfners, die einer Medizinstudentin die Biochemie nähergebracht haben.

Und zu guter Letzt: danke an meine Freunde und Familie, die mich in dieser Arbeit immer unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

			
Eidesstattliche Versicherung			

Sebisch, Rena Julia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Entwicklung eines Fusionsproteins zur lokalen Immunsuppression

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 06.12.2024

Ort, Datum

Rena Julia Sebisch

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand